

MARCELO SOARES FERNANDES

**O ANTAGONISTA CANABINÓIDE SR141716A FACILITA A  
CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA NO LABIRINTO EM “T”  
ELEVADO**

FLORIANÓPOLIS-SC

2002

MARCELO SOARES FERNANDES

**O ANTAGONISTA CANABINÓIDE SR141716A FACILITA A  
CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA NO LABIRINTO EM “T”  
ELEVADO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do  
título de Mestre.  
Curso de Pós-graduação em Farmacologia,  
Centro de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Santa Catarina.  
Orientador: Prof. Dr. Reinaldo N. Takahashi

FLORIANÓPOLIS-SC

2002

FERNANDES, Marcelo Soares. **O antagonista canabinóide SR141716A facilita a consolidação da memória no labirinto em "T" elevado.** Florianópolis, 2002, 80 pp. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

Defesa: 04/10/2002

Os efeitos do antagonista do receptor canabinóide CB1, SR141716A, nos processos de aprendizado e memória foram investigados em camundongos avaliados no labirinto em T elevado (LTE). A influência da co-administração do antagonista com drogas prejudiciais à memória, como a escopolamina (ESCO) e o midazolam (MDZ), também foi investigada usando o mesmo modelo. O procedimento experimental consistiu de treinamento para aquisição de uma esQUIVA inibitória (EI) e posterior avaliação nas sessões de teste e reteste. Os resultados mostraram que o SR141716A facilitou a consolidação da memória. Essa influência foi detectada após uma semana, no reteste. O SR141716A também atenuou o prejuízo da EI provocado pela ESCO sem alterar os prejuízos provocados pelo MDZ. Os resultados sugerem que o SR 141716A apresenta efeito facilitatório na consolidação da memória possivelmente pelo envolvimento parcial de mecanismos colinérgicos.

Palavras Chave: Canabinóide, SR141716A, Memória, T-elevado, EsQUIVA, Escopolamina, Reteste

*Não julgue a eternidade  
Por este momento*

Vera Soares Fernandes

***Dedico esta dissertação ...***

*... à minha família, cujo apoio e incentivo foram fundamentais em minha trajetória.*

*... à Francine, companheira, incentivadora, amiga ..., pelo carinho e paciência.*

*... ao Alcides, pela amizade, apoio e solidariedade.*

## **AGRADECIMENTOS**

- *Ao professor Dr. Reinaldo, pela paciência e dedicação prestada em minha orientação, pelo senso crítico e por guiar os meus passos na direção certa.*
- *Aos professores do Departamento de Farmacologia, pela contribuição à minha formação científica.*
- *Aos companheiros do laboratório de Psicofarmacologia: George, Edmar, Rui, Leandro, Fabrício, Luciano, Kênia e Mônica, pela troca de conhecimento e, principalmente, pela amizade formada.*
- *Ao prof<sup>o</sup>. Dr. Pádua e seus alunos Patrícia, Nelson, Leandro e Karina, pelo apoio técnico, troca de informações e amizade no decorrer deste trabalho.*
- *À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.Gina e seus alunos Adriana, Alcides, Beth, Roberta, Rafael, Gislaine e Alexandra, pelo intercâmbio entre os nossos laboratórios e o convívio agradável dessa interação.*
- *Aos colegas de turma, pelo companheirismo no decorrer do curso.*
- *A todos os funcionários da Coordenadoria que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial, à Diana pelo espírito de solidariedade.*
- *À SANOFI (França), pela doação do SR141716A, ferramenta valiosa para o desenvolvimento deste trabalho.*
- *Ao CNPq, pelo suporte financeiro na contribuição deste trabalho.*
- *À Francine que, apesar da distância, esteve sempre ao meu lado, compartilhando estes anos de trabalho, alegria e angústia.*
- *Agradeço especialmente aos meus familiares que me ofereceram o incentivo necessário para o término deste trabalho. Obrigado!*
- *Agradeço a Deus, pela conclusão deste trabalho.*
- *Enfim, a todos os amigos e as pessoas que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, quer criticando quer apoiando. A todos vocês, muito obrigado!*

## RESUMO

O presente estudo examinou os efeitos do antagonista do receptor canabinóide CB1, SR141716A, em diferentes fases envolvidas nos processos de aprendizado e memória avaliados em camundongos expostos ao labirinto em T elevado (LTE). Além disso, a influência da co-administração do antagonista com drogas prejudiciais à memória, como escopolamina e midazolam, também foi investigada usando o mesmo modelo. O procedimento experimental consistiu em treinamento de camundongos no LTE até a aquisição de uma resposta de esquiva inibitória (EI) que, após, foi avaliada durante as sessões de teste e reteste. Os resultados mostraram que o SR141716A (0,5; 1 e 2 mg/Kg, ip) administrado antes da sessão de treinamento não afetou a aquisição da EI no LTE. Durante o teste, 24 h depois do treinamento, os camundongos tratados com SR141716A (1 mg/Kg) mostraram um melhor desempenho da EI. Nestas respostas, foi parcialmente descartada a ansiedade relacionada com os efeitos induzidos pelo tratamento com SR141716A, através de um experimento paralelo em que se testou os camundongos no teste de ansiedade do labirinto em cruz elevado. Nos experimentos em que se examinou a fase de consolidação, os camundongos tratados com SR141716A (1 mg/Kg) imediatamente depois do treinamento, e testados 24 h e 7 dias após, mostraram melhor desempenho do que os grupos controle no LTE. Já nos estudos da evocação da memória, a administração de SR141716A (1 mg/Kg), pouco antes do teste, não resultou em melhor desempenho dos animais. No caso das drogas com efeitos deletérios à memória, somente a associação escopolamina (1 mg/Kg) + SR141716A (1 mg/Kg) pareceu ser efetiva na prevenção dos efeitos prejudiciais da escopolamina administrada sozinha, no LTE. Em suma, essas constatações sugerem que o antagonista do receptor canabinóide SR141716A melhora a consolidação da memória avaliada em camundongos expostos ao LTE. Esses resultados fornecem, também, evidências de um envolvimento parcial de mecanismos colinérgicos nos processos de aprendizado/memória afetados pelo SR141716A.

## **ABSTRACT**

The present study examined the effects of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A on different phases involved in the process of learning and memory evaluated in mice exposed to the elevated T-maze (ETM). Further, the influence of the antagonist co-administration with memory impairing drugs such as scopolamine and midazolam was also investigated using the same model. The experimental procedure consisted of training the mice on ETM until the acquisition of an inhibitory avoidance (IA) response that, after, was evaluated during the test and retest sessions. SR141716A (0,5; 1 and 2 mg/Kg, ip) administered before the training session did not affect avoidance acquisition on ETM. During the test, 24 h after training, mice treated with SR141716A (1 mg/Kg) showed an improved performance of IA. These responses were partially discarded from anxiety related effects induced by SR141716A treatment through a parallel experiments testing mice on the elevated plus-maze test of anxiety. In the experiments examining the consolidation phase, mice treated with SR141716A (1 mg/Kg) immediately after training and tested 24 h and 7 days later showed better performance than control groups on the ETM. Only the association scopolamine (1 mg/Kg) + SR141716A (1 mg/Kg) appeared to be effective in preventing the impairing effects of scopolamine alone on ETM. These findings suggest that the cannabinoid receptor antagonist SR141716A enhances memory consolidation as evaluated in mice exposed to ETM. These results also provide evidence for a partial involvement of cholinergic mechanisms on the learning/memory processes affected by SR141716A.



## LISTA DE ABREVIACES

$\Delta^9$ -THC	$\Delta^9$ -Tetrahidrocanabinol
ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
BZD	Benzodiazepnico
EI	Esquiva inibitória
E.P.M.	Erro padrão da média
ESCO	Escopolamina
GABA	cido gama-amino-butírico
i.p.	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em cruz elevado
LTD	Depressão de longo prazo
LTE	Labirinto em T elevado
LTP	Potenciao de longo prazo
MDZ	Midazolam
SNC	Sistema nervoso central
SR141716A	N-(piperidina-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Labirinto em T elevado, derivado do LCE .....	16
<b>Figura 2</b> – Efeito do SR141716A no LCE .....	28
<b>Figura 3</b> – Efeito do SR141716A na aquisição da EI .....	31
<b>Figura 4</b> – Efeito do SR141716A na latência de saída e na avaliação de risco 24 h após o treino no LTE .....	32
<b>Figura 5</b> – Efeito do SR141716A (1 mg/Kg), administrado logo após o treino, na latência de saída e na avaliação de risco, 24 h e 7 dias, após o treino .....	35
<b>Figura 6</b> – Efeito do SR141716A (1 mg/Kg), administrado 20 min antes do teste, na latência de saída e na avaliação de risco, 24 h após o treino.....	37
<b>Figura 7</b> – Efeito da escopolamina na aquisição da EI no LTE .....	39
<b>Figura 8</b> – Efeito da escopolamina na latência de saída e na avaliação de risco 24 h após o treino no LTE .....	40
<b>Figura 9</b> – Influência do SR141716A sobre o efeito da escopolamina na aquisição da EI no LTE .....	43
<b>Figura 10</b> – Influência do SR141716A no efeito da escopolamina (1 mg/Kg) na latência de saída e na avaliação de risco 24 h após o treino .....	44
<b>Figura 11</b> – Efeito do midazolam na aquisição da EI no LTE .....	46
<b>Figura 12</b> – Efeito do midazolam na latência de saída e na avaliação	

de risco 24 h após o treino no LTE ..... 47

**Figura 13** – Influência do SR141716A sobre os efeitos do midazolam na aquisição da EI, número de treinos e latência total no LTE ..... 50

**Figura 14** – Influência do SR141716A no efeito do midazolam (1,5 mg/Kg) na latência de saída do e na avaliação de risco 24 h após o treino no LTE ..... 51

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1 Canabinóides .....</b>	<b>01</b>
<b>1.2 SR141716A, antagonista canabinóide, e seus efeitos .....</b>	<b>03</b>
<b>1.3 Memória .....</b>	<b>07</b>
<b>1.4 Ansiedade .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.1 Reações comportamentais no sistema aversivo .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5 Modelos animais de ansiedade e memória .....</b>	<b>13</b>
<b>1.5.1 O labirinto em cruz elevado (LCE) .....</b>	<b>13</b>
<b>1.5.1.1 O reteste no LCE .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.2 O labirinto em T elevado (LTE) .....</b>	<b>16</b>
<b>1.5.2.1 O reteste no LTE .....</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Animais .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Drogas .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3 Equipamentos .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.1 Labirinto em T elevado .....</b>	<b>22</b>

3.3.1.1 Procedimentos .....	22
3.3.2 Labirinto em cruz elevado ( <i>pluz-maze</i> ) .....	25
3.3.2.1 Procedimento .....	25
3.4 Análise estatística .....	26
 4. RESULTADOS .....	 27
4.1 <u>Experimento 1</u> . Efeitos do SR141716A sobre as respostas comportamentais no LCE .....	28
4.2 <u>Experimento 2</u> . Efeitos do SR141716A sobre a aquisição, e recuperação após 24 h, da resposta de EI no LTE .....	29
4.3 <u>Experimento 3</u> . Efeitos do SR141716A sobre a consolidação da resposta de EI, 24 h, e 7 dias, após o treino no LTE .....	33
4.4 <u>Experimento 4</u> . Efeitos do SR141716A sobre a evocação da resposta de EI, 24 h após o treino no LTE .....	36
4.5 <u>Experimento 5</u> . Efeitos da escopolamina sobre a resposta de EI, na aquisição e 24 h após o treino no LTE .....	38
4.6 <u>Experimento 6</u> . Influência do SR141716A sobre os efeitos da escopolamina, na aquisição e 24 h após o treino no LTE .....	41
4.7 <u>Experimento 7</u> . Efeitos do midazolam sobre a resposta de EI, na aquisição e 24 h após o treino no LTE .....	45
4.8 <u>Experimento 8</u> . Influência do SR141716A sobre os efeitos do midazolam, na aquisição e 24 h após o treino no LTE .....	48
 5. DISCUSSÃO .....	 52
 6. CONCLUSÃO .....	 67
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	 68

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Canabinóides

O uso da maconha (*Cannabis sativa*) é conhecido há mais de 4000 anos, e, ao longo desse tempo, tem sido usada para tratar várias enfermidades. Recentemente, a *Cannabis sativa* voltou a ter interesse terapêutico, por sua indicação no tratamento da êmese, glaucoma, anorexia e esclerose múltipla (Ameri, 1999). Entretanto, seu uso é limitado, devido a uma série de outros efeitos indesejáveis, como a dificuldade de concentração, prejuízo da memória e, principalmente, o seu uso como droga de abuso (Schlicker e Kathmann, 2001).

Somente em 1964, o princípio psicoativo da *Cannabis sativa* foi quimicamente caracterizado:  $\Delta^9(-)$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Gaoni e Mechoulam, 1964). Devido às suas características lipofílicas, acreditava-se que o seu mecanismo de ação era baseado na propriedade do  $\Delta^9$ -THC de “perturbar” a membrana celular, e não se pensava, inicialmente, em um receptor específico.

Entretanto, em 1988, o receptor canabinóide foi evidenciado (Devane *et al*, 1988). Após a clonagem e caracterização molecular do primeiro receptor canabinóide CB1, um subtipo de distribuição predominantemente central (Matsuda *et al*, 1990), seguiu-se a caracterização do subtipo CB2 periférico (Munro *et al*, 1993), sendo ambos pertencentes à superfamília de receptores acoplados à proteína G. Assim, acredita-se que a maconha, por intermédio de seu princípio ativo  $\Delta^9$ -THC, exerce seus efeitos no sistema nervoso central (SNC) e

em tecidos periféricos, agindo em receptores canabinóides CB1 e CB2, respectivamente. Contudo, estudos recentes têm indicado a possibilidade da existência de um terceiro subtipo de receptor canabinóide (“CB3”) (Wilson e Nicoll, 2002).

A distribuição de receptores canabinóides CB1 no cérebro está relacionada com a sua localização em áreas envolvidas no controle do movimento (gânglios da base e cerebelo), na cognição (córtex cerebral), na atenção e na memória (hipocampo e amígdala); enquanto os receptores CB2 têm sido detectados principalmente em tecidos periféricos, incluindo o baço e células do sistema imune, como as células-B, T e monócitos, explicando as propriedades imunossupressoras da *Cannabis sativa* (Ameri, 1999). Receptores canabinóides são também encontrados em áreas que controlam a êmese (núcleo do trato solitário) e a dor, sugerindo o potencial terapêutico da maconha.

Em 1992, o entendimento do sistema canabinóide obteve grande avanço com a identificação do primeiro ligante endógeno de receptores CB1 (Devane *et al.*, 1992). Esta substância, presente no cérebro, derivada de ácidos graxos, araquidoniletanolamida, foi denominada de anandamida, sendo que a palavra “ananda”, originária do sanscrito, significa “felicidade” e “amida” decorre da existência desse grupo químico em sua estrutura.

No cérebro de roedores, a anandamida reproduziu os efeitos comportamentais típicos do  $\Delta^9$ -THC, como a inibição da atividade locomotora no campo aberto e em teste de imobilidade, analgesia na placa quente e hipotermia (Mechoulam e Fride, 1995). Além disso, nestes testes, a anandamida exibe tolerância cruzada para o  $\Delta^9$ -THC (Fride, 1995). Algumas diferenças entre a anandamida e canabinóides exógenos foram também observadas. Por exemplo, a baixa potência de anandamida em alguns ensaios *in vitro*, o que sugere que a anandamida pode agir como um agonista parcial do receptor CB1. Além da

anandamida, outros endocanabinóides foram identificados, inclusive o 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam *et al*, 1995; Sugiura *et al*, 1996).

Desta forma, o entendimento do papel neurofisiológico de receptores canabinóides e de endocanabinóides reflete o conhecimento adquirido por mais de três décadas de pesquisa da farmacologia, na distribuição e função de receptores canabinóides (Pertwee, 1997).

## **1.2 SR141716A, antagonista canabinóide, e seus efeitos**

Um grande avanço no estudo do sistema canabinóide ocorreu com a publicação, em 1994, por Rinaldi-Carmona *et al*, a respeito de um derivado pirazol, N-(piperidina-1-il)-5-(e-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (SR141716A), um antagonista desenvolvido pela Sanofi Recherche, que se ligava com alta afinidade ao receptor CB1 no cérebro de rato, revertendo completamente *in vitro* e *in vivo* as ações do potente composto canabimimético WIN 55,212-2 (Rinaldi-Carmona *et al*, 1994). Esse foi um passo importante para a identificação e o entendimento de endocanabinóides e outros agentes canabimiméticos nesse sistema.

Estudos subseqüentes mostraram que o antagonista canabinóide SR141716A bloqueia competitivamente os receptores CB1 e CB2, sendo que sua afinidade pelos receptores CB1 é da ordem nanomolar, enquanto que pelos receptores CB2, é da ordem micromolar, ou seja, sua afinidade pelos primeiros é 1000 vezes superior àquela encontrada para os receptores CB2 (Rinaldi-Carmona *et al*, 1994,1995).

Inicialmente, Rinaldi-Carmona *et al* (1994) mostraram que baixas doses de SR141716A não afetam a temperatura corporal, a analgesia medida nos testes de latência da retirada de cauda e a atividade locomotora de ratos. De modo similar, foi observado que o SR141716A não altera a frequência cardíaca e respiratória em macacos Rhesus (Vivian *et al*, 1997). Além disso, nenhum efeito tem sido



demonstrado na precisão ou taxa de resposta em tarefas de aprendizado com doses acima de 32 mg/Kg, i.p. (Brodkin *et al*, 1997). No entanto, a administração aguda do SR141716A antagoniza os efeitos motores, hipotérmicos, propriedades discriminativas e efeitos antinociceptivos de canabinóides em roedores e primatas (para revisão ver Nakamura-Palácios *et al*, 1999). Além disso, sabe-se que o SR141716A atenua o prejuízo da memória induzido por  $\Delta^9$ -THC em vários procedimentos, como o teste da amostra não complementar diferida (Mallet *et al*, 1997), testes de acuidade no labirinto radial em ratos (Lichtman e Martin, 1996) e no labirinto aquático de Morris em camundongos (Da Silva e Takahashi, 2002).

Vários estudos têm mostrado a participação de receptores para acetilcolina (ACh) em processos relacionados com o aprendizado e a formação da memória (Ganzu *apud* Porsolt *et al*, 1993; Izquierdo *et al*, 1997). Nesse sentido, para verificar a relação entre canabinóides e neurônios colinérgicos, Lichtman e Martin (1996) investigaram se o sistema canabinóide e colinérgico prejudicam a memória operacional de ratos por um mecanismo comum aos dois sistemas. Essa hipótese foi testada no labirinto radial, examinando-se se o SR141716A diminui os déficits de desempenho do animal, provocados por  $\Delta^9$ -THC ou escopolamina, um antagonista colinérgico muscarínico. Do mesmo modo, foi investigado se o aumento da concentração da acetilcolina, através de um inibidor da colinesterase, fisiostigmina, revertia o prejuízo da memória espacial provocado por  $\Delta^9$ -THC.

Como resultado desse estudo, o antagonista canabinóide SR141716A reverteu, de modo dose-dependente, os déficits provocados por  $\Delta^9$ -THC, mas não reverteu os déficits provocados por escopolamina. Do mesmo modo, a fisiostigmina não reverteu os déficits provocados por  $\Delta^9$ -THC. Esses dados sugerem que os déficits provocados por  $\Delta^9$ -THC e escopolamina, no labirinto radial, não ocorrem por vias comuns aos sistemas canabinóide e colinérgico.

Seguindo essa mesma linha, em um estudo de aprendizado em macacos-esquilo, o prejuízo provocado por  $\Delta^9$ -THC, como esperado, foi revertido com

baixas doses de SR141716A. No entanto, no prejuízo de aprendizado provocado por escopolamina, o SR141716A em baixas doses, além de não reverter o prejuízo do aprendizado, aumentou a frequência de erros. Além disso, curiosamente, o SR141716A, administrado isoladamente em altas doses, também aumentou a taxa de erros (Nakamura-Palacios *et al*, 2000).

Desta forma, apesar desses estudos sugerirem que os prejuízos do aprendizado ocorram por vias distintas entre os dois sistemas, outros estudos têm mostrado que a liberação de acetilcolina, induzida eletricamente em fatias do hipocampo, é inibida por agonistas canabinóides e potencializada pelo antagonista SR141716A (Gifford e Ashby, 1996). Esses dados sugerem que a acetilcolina pode ser tonicamente inibida por canabinóides endógenos, já que altas doses do antagonista aumentam a liberação hipocampal de acetilcolina, mostrando a interferência do bloqueio do sistema canabinóide na via colinérgica, o qual poderia facilitar a memória.

Assim, persiste a controvérsia sobre a relação entre o sistema canabinóide e o colinérgico, na modulação da memória (Pertwee, 1997).

De qualquer modo, embora a hipótese colinérgica continue sendo muito importante para as pesquisas com drogas que podem melhorar a cognição, um papel puramente colinérgico para a memória tem sido questionado (Briley, 1990) e muitos outros sistemas parecem também apresentar papel fundamental na memória.

Apesar do perfil de antagonista típico, relatado por Rinaldi-Carmona *et al* (1994) no início de seus estudos, pesquisas recentes têm mostrado que o SR141716A apresenta, *per se*, alguns efeitos similares aos provocados pelo agonista canabinóide. Geralmente, esses efeitos ocorrem em doses altas (10 a 30 mg/Kg i.v.), produzindo prejuízo no aprendizado de macacos (Nakamura-Palacios, 2000) ou, por exemplo, um efeito antinocepcivo no teste de retirada de cauda (Compton *et al*, 1996).

Os resultados de outros estudos (Richardson *et al*, 1997), entretanto, mostram que os efeitos do SR141716A, *per se*, são opostos aos efeitos dos agonistas canabinóides. Assim, animais que receberam injeção intratecal de SR141716A apresentaram hiperalgesia significativa, quando comparados com animais que receberam salina. Além disso, esse composto, quando administrado agudamente, tem apresentado um efeito ansiogênico no labirinto em cruz elevado (LCE) (Navarro *et al*, 1997).

No mesmo sentido, em estudos com memória em roedores, o SR141716A, administrado sozinho (0,03 a 3 mg/Kg, i.p.), melhora a memória social de curto prazo em roedores adultos e idosos (Terranova *et al*, 1996). Da mesma forma, ratos tratados com SR141716A (3 mg/Kg) apresentam melhor desempenho da memória espacial avaliada no labirinto radial (Lichtman, 2000).

Esses últimos dados sugerem que o antagonista canabinóide SR141716A não apenas reverte os prejuízos causados pelo  $\Delta^9$ -THC, como também, *per se*, melhora o aprendizado de roedores, nos modelos de memória citados.

Assim, a participação de endocanabinóides na modulação da memória parece ser uma possibilidade para explicar os efeitos do SR141716A *per se*. Nesse sentido, estudos recentes têm mostrado a participação de receptores CB1 em interneurônios GABAérgicos, no hipocampo e neocórtex, sugerindo a função de endocanabinóides na liberação do ácido gama-amino-butírico (GABA), modulando funções relacionadas com o processo cognitivo e de memória (Wilson e Nicoll, 2002).

De fato, estudos recentes utilizando camundongos geneticamente modificados, sem receptores CB1, ou camundongos normais tratados com o antagonista canabinóide SR141716A, têm apresentado resultados consistentes do envolvimento de endocanabinóides no processo de extinção da memória de fundo aversivo. Esses resultados sugerem o papel de endocanabinóides, como anandamida e 2-araquidonilglicerol, os quais poderiam exercer um papel

fisiológico importante no processo de extinção da memória. Esse estudo sugere, ainda, a possível participação de receptores CB1 existentes em interneurônios GABAérgicos localizados na amígdala, modulando esse processo (Marsicano *et al*, 2002).

Apesar da complexidade dos aspectos envolvidos com a modulação da memória, esses resultados recentes da literatura mostram um importante foco de investigação do sistema canabinóide, ao qual este trabalho apresenta sua contribuição.

### **1.3 Memória**

Conforme mencionado anteriormente, um dos aspectos comportamentais claramente influenciados pelo sistema canabinóide diz respeito ao déficit no aprendizado e na memória. Como a presente dissertação pretende estender a investigação em um modelo de memória, o entendimento, mesmo que resumido, de como esses eventos ocorrem, é fundamental para compreendermos as possíveis implicações do sistema canabinóide na modulação da memória.

Assim, a maneira pela qual o cérebro apreende a informação (aquisição), armazena-a (consolidação) e, posteriormente, a recupera (evocação), tem sido alvo de intensa investigação há muito tempo. O fenômeno da memória é um processo dinâmico e, além das etapas de aquisição, consolidação e evocação, pode também ocorrer a extinção e a reconsolidação da memória (Abel e Lattal, 2001).

Podemos entender que a formação da memória tem início com a aquisição de informações recebidas por intermédio de estímulos, detectados pelos sistemas sensoriais, sendo devidamente processadas. Esse sistema inicial de processamento decorre de múltiplos subcomponentes (visual-espacial, fonológico, centro executivo) que receberão as informações das diferentes vias sensoriais, para serem processadas em curto período de tempo (Baddeley, 1998). Esse processo

“temporário”, conhecido como memória operacional ou de trabalho, ocorre no córtex pré-frontal e parte do giro do cíngulo e é responsável por um armazenamento transitório da informação necessária para a utilização de tarefas operacionais complexas como compreensão de linguagem, aprendizado e raciocínio (Atkinson e Shiffrin, 1986; Baddeley, 1992).

Para que essa informação “transitória” se torne mais estável e, conseqüentemente, mantenha-se por maior tempo “armazenada”, é necessário que ocorra um processo de consolidação da memória, que pode ser de uma memória de curto prazo (minutos ou algumas horas) ou uma memória de longo prazo (muitas horas, dias ou anos), sendo que a memória de curto prazo não é pré-requisito para a formação daquela de longo prazo (Squire, 1992; Izquierdo *et al*, 1998).

Acredita-se que essa forma mais estável da memória seja decorrente da formação de plasticidade, fenômeno em que ocorre o prolongamento neuronal e a formação de novas conexões sinápticas. Ao que parece, a plasticidade pode ocorrer também sob a forma de curto prazo e longo prazo. A plasticidade de curto prazo envolveria somente alterações covalentes de proteínas pré-existentes, ao passo que a plasticidade de longo prazo requer alterações na expressão gênica e síntese de novas proteínas, para o estabelecimento de novas conexões (Frey *et al*, 1993; Bailey *et al*, 1999; Schafe *et al*, 2001).

O possível mecanismo bioquímico para explicar a consolidação da memória é conhecido como potenciação de longo prazo ou *long-term potentiation* (LTP). Assim, a LTP, como também a LTD, depressão de longo prazo (*long term depression*), são os principais mecanismos neurais subjacentes à formação de memórias no cérebro por um longo período de tempo (Bliss e Collingridge, 1993).

Após o processo de aquisição e consolidação da memória, essa informação pode ser extinta ou reconsolidada. De fato, estudos têm mostrado que, logo após a evocação da informação já consolidada (lembração), ocorre um novo processo de

consolidação (reconsolidação), em que os eventos moleculares são similares à memória de curto prazo e, desta forma, suscetível de interferências. Portanto, pode-se tanto fortalecer as conexões neurais existentes, beneficiando a memória, como também desfazer e refazer novos circuitos neurais, gerando amnésia, novo aprendizado ou extinção da memória anterior (Przybyslawski e Sara, 1997; Abel e Lattal, 2001; Schafe *et al*, 2001).

As memórias também podem ser classificadas em memórias declarativa (ou explícita) e não declarativa (ou implícita).

A memória declarativa é aquela que é comumente chamada de memória propriamente dita. É a memória de fatos, eventos, seqüência de eventos, idéias, que podem ser relatados, que são acessíveis conscientemente. Essa memória depende da região do lobo temporal, principalmente do hipocampo, que tem muitas fibras de conexão com o córtex pré-frontal, entorrinal e parietal (Witter *et al*, 1989; Zola-Morgan e Squire, 1990; Squire, 1992; Riedel e Micheau, 2001).

Já a memória implícita, conhecida como memória de hábitos, é uma memória sujeita a responder a estímulos através da prática. Esse processo inclui a capacidade para detectar ou identificar objetos como resultado de contatos anteriores recentes, um fenômeno conhecido como *priming*. No caso da memória implícita, o desempenho vai alterando-se em função da experiência, justificando o termo memória, no entanto, não ocorre um acesso consciente ao episódio (Squire *et al*, 1993). As memórias implícitas incluem tarefas de habilidades motoras (andar de bicicleta) e de percepção (esquivar-se de um choque elétrico ao ouvir um som sinalizador), estudadas em testes de condicionamento clássico, operante e memórias associativas.

Em estudos para verificar a participação das estruturas cerebrais no armazenamento da memória implícita, em humanos e animais, demonstrou-se que alguns hábitos aprendidos perduram mesmo quando são ocasionados danos no hipocampo, mas ocorrem prejuízos significativos quando o dano ocorre no *caudado putamen* (Packard *et al*, 1989; Knowlton *et al*, 1996).

O aprendizado emocional, bem como o desenvolvimento de fobias ou o medo condicionado, é dependente da amígdala (LeDoux, 1995; Davis *et al*, 1997). De fato, lesões na amígdala bloqueiam a expressão do medo condicionado, como a imobilidade desencadeada por um estímulo aversivo. Lesões na amígdala realizadas dois dias após o treino prejudicam o desempenho de retenção da esQUIVA passiva (Parent e McGaugh, 1994). A amígdala tem sido mostrada como sendo importante para o aprendizado emocional em humanos (Cahill *et al*, 1996). Além disso, a amígdala é essencial, não somente para o aprendizado emocional, como também exerce seus efeitos modulatórios em outros sistemas de memória (McGaugh *et al*, 1996). Assim, a amígdala, juntamente com o hipocampo e o córtex entorrinal, participa da memória, através de suas conexões com o córtex parietal e pré-frontal (Witter *et al*, 1989). Diante do envolvimento da amígdala nos processos de memória e de sua importante participação na formação do medo, atribui-se a essa estrutura um tipo específico de memória, chamada memória emocional, envolvendo um aprendizado implícito (não consciente) e armazenamento de informações com significados do evento emocional (LeDoux, 1992, 1995).

#### **1.4 Ansiedade**

Quando um animal é confrontado com uma ameaça ao seu bem-estar, à sua integridade física ou à própria sobrevivência, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo. Tal ameaça pode ser representada por um estímulo material incondicionado, como um predador ou um agressor da mesma espécie, ou por estímulos aprendidos que, por associação repetida com dor ou outras sensações igualmente desagradáveis, adquirem propriedades aversivas condicionadas. Em circunstâncias onde o perigo é apenas potencial, havendo, portanto, um componente de incerteza, teríamos a ansiedade (Graeff *et al*, 1993).

A ansiedade é um fenômeno essencial para uma adaptação biológica normal. Há, entretanto, fatores ambientais e constitucionais envolvidos na sua etiologia, cuja contribuição varia individualmente. A ansiedade pode apresentar-se como traço de ansiedade, próprio da constituição da personalidade de determinados sujeitos. Pode, também, apresentar-se como estado de ansiedade, que ocorre como uma manifestação de uma reação psicogênica ao estresse, de menor duração (Edwards, 1991). Clinicamente, tem-se reconhecido que ansiedade não é um fenômeno unitário, e tem sido postulada a existência de diferentes tipos de ansiedade patológica, como o pânico, fobias e estresse pós-traumático (Graeff *et al*, 1998).

Existe a hipótese de que o excesso do neurotransmissor 5-hidroxitriptamina (5-HT), serotonina, leve a um aumento dos sintomas de ansiedade, enquanto que a redução da atividade serotoninérgica a diminua (Graeff e Schoenfeld, 1970). No entanto, acredita-se hoje que outros neurotransmissores também estejam envolvidos na modulação da ansiedade. A eficácia dos benzodiazepínicos como agentes ansiolíticos é a principal evidência do envolvimento do receptor do ácido gama-amino-butírico (GABA) na ansiedade.

Os receptores GABA<sub>A</sub>, que são os principais receptores inibitórios do sistema nervoso central dos mamíferos (Delory e Olsen, 1994), possuem sítios para a ligação dos benzodiazepínicos (BZDs) que modulam a resposta para a ligação do GABA e influenciam a abertura dos canais de Cl<sup>-</sup>, caracterizando um evento inibitório.

Exemplos de benzodiazepínicos são o diazepam, bromazepam, lorazepam, midazolam, entre outros. Os efeitos farmacológicos dessas drogas vão desde a ação ansiolítica até a propriedade hipnótica. Doses mais elevadas podem causar amnésia anterógrada, onde o paciente esquece muitos fatos ocorridos após tomar a droga (Graeff, 1996).

Áreas como o hipocampo e a amígdala, no sistema límbico, onde há uma grande concentração de receptores GABA<sub>A</sub>, sugerem que esses receptores estão



diretamente envolvidos no processo de consolidação da memória de eventos aversivos, bem como na fisiopatologia da ansiedade (Izquierdo *et al*, 1991).

#### 1.4.1 Reações comportamentais no sistema aversivo

A sobrevivência de muitas espécies está relacionada com uma variedade de reações que envolvem a capacidade de perceber o perigo e a agilidade de afastar-se dele, através de várias vias neurais que geram um comportamento defensivo ou de fuga (Fanselow, 1991). O perigo e a ameaça podem ser provocados por alterações no ambiente natural do animal (tempestades, incêndio); por predadores ou estímulos associados (gato ou seu odor para o rato); por determinados estímulos ambientais (iluminação e altura do som para roedores) ou pelo ataque de animais da mesma espécie (Blanchard *et al*, 1993; Graeff, 1993).

A observação sistemática do comportamento do rato, em confrontação com predadores, levou a caracterização de diferentes estratégias de defesa (Graeff e Guimarães, 1999):

- 1) **Avaliação de risco:** ratos que haviam fugido de uma arena devido à presença de um gato, refugiando-se em uma toca, voltavam a explorar a mesma arena, de modo muito cuidadoso, após a retirada do gato. Em geral, o macho dominante da colônia espia várias vezes através de uma das saídas da toca, antes de entrar na arena, ficando com o corpo estirado e o ventre rente ao chão. Estes comportamentos visam obter informação sobre o perigo, tendo sido denominados de avaliação de risco. Aos poucos o animal vai-se locomovendo com mais desenvoltura, e os demais membros da colônia vão deixando o abrigo para explorar a arena. Comportamentos de avaliação de risco também ocorrem diante de estímulos ou situações novas ou imprevistas. A novidade gera conflito entre a motivação de explorar o ambiente e o receio de possível perigo.

- 2) **Congelamento:** o rato reage com imobilidade tônica ou congelamento à aproximação de um predador, quando este se acha além de uma distância crítica.
- 3) **Fuga:** ultrapassada a distância de aproximação crítica, o rato corre, executando uma fuga.
- 4) **Ameaça:** na impossibilidade de fuga, diante da aproximação do predador, o rato faz uma ameaça, assumindo postura ereta e emitindo guinchos.
- 5) **Ataque defensivo:** após a ameaça, o rato ataca violentamente.

Assim, Blanchard *et al* (*apud* Graeff e Guimarães, 1999) sugeriram que cada uma dessas formas de defesa corresponde um tipo de medo ou ansiedade, cujo substrato neural é específico.

## 1.5 Modelos animais de ansiedade e memória

O modelo experimental de determinada condição normal ou patológica representa uma tentativa de se estabelecer um sistema de teste, possibilitando a simulação de certos aspectos da condição clínica ou normal. Permite analisar a ação de agentes conhecidos e detectar o potencial terapêutico de novas drogas (Porsolt *et al*, Lenegre, 1993).

### 1.5.1 O labirinto em cruz elevado (LCE)

Um dos modelos mais utilizados com o propósito de avaliar o grau de aversividade a ambientes abertos e elevados, como parâmetro de resposta de ansiedade espontânea de roedores, é o labirinto em cruz elevado (LCE). Este modelo consiste de dois braços abertos e dois fechados. Foi desenvolvido a partir do trabalho de Montgomery (1955), por Handley e Mithani, em 1984, e, posteriormente, foram realizados experimentos para a validação comportamental,

fisiológica e farmacológica deste teste para ratos (Pellow *et al*, 1985; Imhof *et al*, 1993) e camundongos (Lister, 1987).

Este modelo avalia a tendência natural dos roedores em esquivar-se de espaços abertos. De fato, observa-se que drogas ansiogênicas diminuem as porcentagens de entrada e de tempo de permanência do animal nos braços abertos, em doses que não afetam a atividade locomotora, a qual é registrada pelo total de entradas nos braços fechados como índice de atividade geral (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al*, 1985). Os animais expostos ao braço aberto do LCE mostram reações de medo, tal como congelamento, defecação e aumento da produção de corticosterona no plasma (Pellow *et al*, 1985).

Novas abordagens têm sido agregadas a esse modelo, como forma de avaliação geral do animal. Nesse sentido, em 1994, Rodgers *et al* adotaram novos parâmetros, como a frequência de levantar, frequência de autolimpeza e frequência de entradas nos braços abertos. Nessa direção, somam-se os estudos realizados por Sanson e Carobrez (1999), mostrando que a frequência de tentativas de saída dos braços fechados é importante na mensuração da avaliação de risco. De fato, a avaliação de risco foi descrita como sendo uma atitude que faz parte do repertório defensivo dos animais (Blanchard R.J. e Blanchard D.C., 1989). Esse comportamento, no LCE, é identificado pela observação do conflito do animal em sair ou não do braço fechado (Sanson e Carobrez, 1999).

#### **1.5.1.1 O reteste no LCE**

Um dos mais intrigantes aspectos deste modelo é o fato de que a exposição prévia ao labirinto reduz ou abole o efeito ansiolítico de agonistas benzodiazepínicos, como o clordiazepóxido e o diazepam (Lister, 1987; File *et al*, 1990; File, 1990, 1993). Tal efeito, chamado de tolerância a um teste (*one-trial tolerance*), indica que o estado de ansiedade, na reexposição, pode ser qualitativamente diferente da experiência da exposição inicial (Rodgers *et al*, 1992). Esses dados sugerem que os animais adquirem uma esquia fóbica dos

braços abertos e, desta forma, podem explicar sua subsequente insensibilidade aos efeitos dos benzodiazepínicos (File e Zangrossi, 1993; File *et al*, 1993).

A principal linha de raciocínio, para explicar o efeito do reteste no LCE, inclui o fato de que a exposição prévia ao labirinto é capaz de liberar agonistas inversos endógenos que ligam-se aos receptores benzodiazepínicos, alterando o seu estado em áreas do cérebro, através de um processo de dessensibilização (Gonzales e File, 1997).

Apesar da literatura claramente mostrar um aumento da esquia dos braços abertos, nos roedores, quando reexpostos ao LCE, sugerindo um estado de ansiedade diferenciado ou um processo de aprendizado, a real origem aversiva desse evento permanece desconhecida.

Neste sentido, Bertoglio e Carobrez (2000) realizaram estudos, expondo ratos previamente a diferentes labirintos modificados do LCE. Esse estudo foi realizado, expondo o animal uma única vez a um labirinto modificado que poderia ter todos os braços abertos, todos os braços fechados ou as variações possíveis entre braços abertos e fechados; 48 horas após a exposição ao labirinto modificado, o animal era exposto ao LCE. Os resultados mostraram que, quando as exposições prévias eram realizadas nas modificações do LCE que apresentavam simultaneamente braço aberto e braço fechado, tiveram, 48 horas depois, um aumento da esquia dos braços abertos do LCE. No entanto, animais previamente expostos às variações do LCE que possuíam somente braços abertos ou braços fechados, ao serem expostos ao LCE, não apresentaram aumento da esquia dos braços abertos. Esses dados, segundo os autores, sugerem a necessidade de dois ambientes com diferentes níveis de aversão, para que o processo da esquia ocorra e altere as respostas da segunda exposição. Assim, o processo de aprendizado envolveria a habilidade cognitiva para a escolha entre dois níveis de situações aversivas, no caso, braço aberto e braço fechado (Bertoglio e Carobrez, 2000).

### 1.5.2 O labirinto em T elevado (LTE)

Apesar das dúvidas a respeito das diferenças de “medidas de ansiedade” ou aprendizado, na segunda exposição, o LCE tem sido classicamente validado apenas para estudos de ansiedade. No entanto, uma variante do modelo do LCE permitiu a validação de um novo modelo, considerando a influência desses aspectos aversivos no aprendizado e memória.

Esse modelo, chamado labirinto em T elevado (LTE), foi descrito inicialmente por Graeff *et al* (1993) e consiste em bloquear um dos braços fechados do LCE, formando um labirinto em T, com dois braços abertos e um fechado (Figura 1).

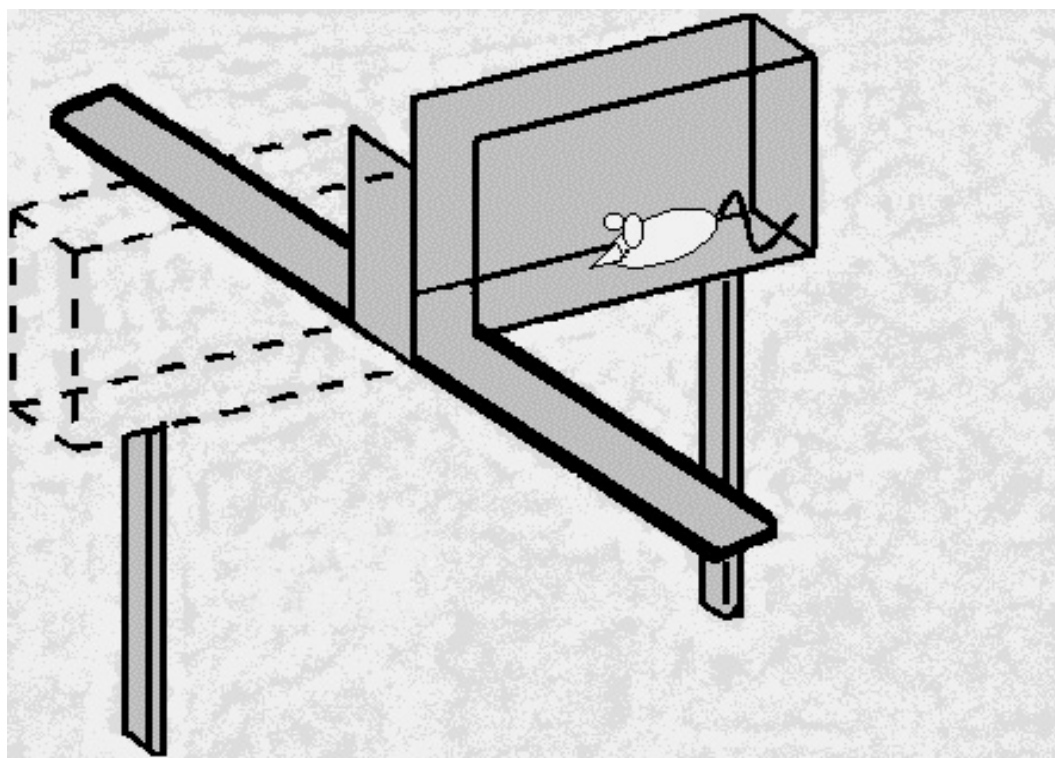


Figura 1 - Labirinto em T elevado, derivado do LCE.

Desta forma, estar em um braço aberto parece ser uma experiência aversiva, pois ratos têm medo inato de locais abertos (Montgomery, 1955; Pellow *et al*, 1985; Treit *et al*, 1993), o que permite ao animal aprender a esquivar-se do

braço aberto, se for colocado repetidas vezes para explorar o labirinto (Zangrossi e Graeff, 1997).

Assim, neste modelo, além do comportamento de esquiva e fuga dos braços abertos, a avaliação de risco também é um parâmetro medido. De fato, Sanson e Carobrez (1999) demonstraram que os valores de avaliação do risco tendem a ser maiores em virtude da primeira exposição do rato ao LTE, seguindo-se de um declínio nas demais sessões.

Devido às exposições repetidas ao LTE, o animal aprende a esquivar-se do braço aberto, num comportamento conhecido como resposta condicionada de medo (Graeff *et al*, 1993; Viana *et al*, 1994; Zangrossi Jr. e Graeff, 1997). A preferência por lugares fechados e escuros, verificada em ratos e camundongos (Montgomery, 1955), faz com que as medidas de latência de saída do compartimento fechado do labirinto sejam crescentes. No entanto, pelo fato de o condicionamento ser uma forma de aprendizado, o medo gerado no LTE pode ser avaliado como medida tanto de ansiedade como de memória. De fato, estudos indicam que os sítios de ação amnésica dos agonistas benzodiazepínicos estão localizados na amígdala anterior e basolateral, as mesmas regiões envolvidas com a ação anticonflito de benzodiazepinas (Graeff *et al*, 1993). Assim, este modelo parece promover uma fonte de análise e entedimento de alguns princípios fisiológicos básicos relacionados com a memória emocional (Sanson e Carobrez, 1999).

No protocolo do LTE, inicialmente, a resposta de EI era avaliada através da medida das latências de saída para os braços abertos por duas vezes consecutivas e, imediatamente após, era medida a primeira latência de fuga dos braços abertos. Depois de 72 horas era realizada a sessão teste, onde eram novamente medidas a latência de esquiva dos braços abertos e a latência de fuga dos braços abertos (Graeff *et al*, 1993).

A validação farmacológica deste modelo foi realizada utilizando o composto ansiolítico diazepam (Graeff *et al*, 1993), bem como outras drogas

supostamente ansiolíticas, as quais causaram um prejuízo na resposta de EI, enquanto agentes conhecidamente ansiogênicos facilitaram a resposta de EI. O comportamento de fuga do braço aberto não foi afetado pela maioria das drogas testadas no LTE (Graeff *et al*, 1998).

Sanson e Carobrez (1999) e Conde *et al* (1999) propuseram um novo procedimento para a utilização do LTE. Este procedimento baseia-se no aprendizado (ou aquisição) de um critério de EI, que consiste na permanência do animal por 300 segundos, continuamente, no interior do braço fechado do labirinto. Além disso, o animal é colocado no labirinto tantas vezes quantas necessárias para que atinja o critério de EI. Utilizando esse protocolo, o LTE foi recentemente validado por De Mello e Carobrez (2002), em um estudo comparativo com outros modelos de memória, como o labirinto aquático de Morris e a esquiwa ativa de duas vias.

Apesar desse procedimento ter sido validado para ratos, não é de nosso conhecimento que o mesmo tenha sido adotado para camundongos. Um protocolo com apenas 3 medidas consecutivas da latência de saída do braço fechado e uma de fuga do braço aberto tem mostrado que o camundongo não adquire EI (Jardim *et al*, 1999). Assim, apesar desses resultados negativos para aquisição da EI em camundongos, a utilização de um protocolo utilizando sucessivas exposições ao LTE até a aquisição de um critério de 300 s de EI, como descrito por Sanson e Carobrez (1999), parece ser passível de adaptação para camundongos.

#### **1.5.2.1 O reteste no LTE**

Aguns estudos pesquisam a reativação da memória. Após um primeiro teste de memória, a reexposição do animal ao mesmo ambiente facilita a evocação da memória em um segundo teste. Nesses experimentos, estuda-se a reconsolidação da memória, ou por interferência ambiental, ou farmacológica (Abel e Lattal, 2001; Schafe *et al*, 2001).

Exemplo disso é que animais que foram treinados para uma tarefa, ao serem recolocados no mesmo ambiente no qual haviam sido treinados, têm um desempenho melhor, para executar a mesma tarefa, do que se fossem colocados em outro ambiente. O ambiente conhecido facilitou a reativação da memória (Abel e Lattal, 2001).

Existem indícios de que a memória, ao ser “reativada”, torna os mecanismos neurais lábeis e vulneráveis a um “reforço” de suas conexões ou à formação de novas conexões, podendo ocorrer um processo de reconsolidação da informação ou um processo de extinção, devido ao novo aprendizado (Przybylski e Sara, 1997).

Além desse enfoque de modelos animais de memória, cabe lembrar que o LCE, do qual o LTE deriva, apresentou perfis comportamentais diferenciados dos animais nos estudos de ansiedade, diante de uma segunda exposição ao modelo (Bertoglio e Carobrez, 2000).

Contudo, não existem informações do perfil de resposta dos animais testados no LTE, frente a uma segunda exposição no reteste. Nesse sentido, embora existam diferenças entre ratos e camundongos, a utilização de um protocolo que é confiável e reprodutível em ratos, e adaptável para camundongos, constitui uma abordagem útil para avaliarmos o perfil comportamental desses animais diante de um reteste.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Investigar a influência do antagonista canabinóide CB1, SR141716A, nos processos de aprendizado e memória em camundongos avaliados no LTE.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Investigar o efeito do SR141716A no processo de aquisição da EI e adotar o reteste como mais um parâmetro para avaliação comportamental de camundongos no LTE.
- Investigar o efeito do SR141716A na consolidação da memória após dois períodos, 24 h e 7 dias.
- Investigar o efeito do SR141716A na evocação da memória após um período de 24 h.
- Confirmar o efeito amnésico do benzodiazepínico midazolam e do antagonista colinérgico escopolamina no LTE, e investigar se o SR141716A afeta os déficits de memória induzidos por essas drogas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos albinos, machos, pesando entre 30 e 40 gramas, com idade em torno de 3 meses. Os animais foram criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC e mantidos, após o desmame, no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Os animais foram mantidos sob condições controladas, a uma temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , com ciclo de luz claro/escuro de 12 h (luz das 7:00 às 19:00 hs), com livre acesso a água e comida. Antes do início de cada sessão experimental, realizada entre 12:00 hs e 17:00 hs, os camundongos foram ambientados no laboratório, durante o período de pelo menos 1 hora.

#### **3.2 Drogas**

O antagonista canabinóide SR141716A (SANOFI Recherche, França) foi homogeneizado com uma gota de Tween 80 e, em seguida, dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%), até completar o volume desejado. O SR141716A foi administrado i.p. nas doses de 0,5; 1,0 e 2 mg/Kg.

O Midazolam (DORMIRE<sup>®</sup>, Lab. Cristália), em ampola de 5 mg/ml, foi diluído em solução salina e administrado i.p. nas doses de 0,5; 1,5; 2,5 e 3 mg/Kg.

A escopolamina-HBr (Sigma) foi dissolvida em solução salina e administrada i.p. nas doses 0,1; 0,5 e 1 mg/Kg. Todos os animais foram tratados com as drogas ou solução controle (NaCl 0,9%), pela via intraperitoneal (i.p.), em um volume correspondente a 10 ml/Kg.

### **3.3 Equipamentos**

#### **3.3.1 Labirinto em T elevado**

O labirinto em T elevado (LTE) foi um modelo inicialmente descrito por Graeff *et al* (1993) para ratos. A exemplo do descrito para ratos, o LTE para camundongos é uma adaptação do labirinto em cruz elevado (LCE), através da utilização de um anteparo que bloqueia um dos braços fechados do LCE, de forma a obter um labirinto com dois braços abertos (30x5 cm) e um braço fechado (30x5x15 cm), ficando elevado a 45cm do chão. Os braços abertos apresentam uma borda lateral de 0,25 cm como proteção, evitando a queda dos animais. O LTE foi todo confeccionado com madeira revestida de fórmica preta. Os testes ocorreram em uma sala isolada, com temperatura mantida a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , iluminação vermelha de baixa intensidade (15W).

##### **3.3.1.1 Procedimentos**

O protocolo inicial aqui utilizado foi adaptado do estudo de Sanson e Carobrez (1999) e Conde *et al* (1999). Resumidamente, os animais eram treinados sucessivamente, até permanecerem no braço fechado por 300 s (esquiva inibitória). No teste, dois parâmetros eram medidos simultaneamente para avaliação da memória: latência de saída do braço fechado e avaliação de risco. Após o teste, um outro teste (reteste) era realizado 30 s após o primeiro, medindo-se os mesmos parâmetros. Ao final do treinamento e, do mesmo modo,

no final do teste/reteste, media-se a fuga do animal do braço aberto (medo incondicionado).

A seguir, detalharemos os procedimentos.

**Treinamento:** os animais eram colocados no final do braço fechado, com a cabeça voltada para o lado aberto, medindo-se o tempo que levavam para sair do braço fechado com as 4 patas (latência). Quando o animal saía do braço fechado em menos de 300 s, era colocado em uma caixa por 30 s e, em seguida, recolocado no braço fechado. Esse procedimento era feito sucessivamente até que o animal adquirisse latência de 300 s (EI). Após, colocava-se o animal no braço aberto e media-se o tempo para sua entrada no braço fechado (fuga). Esse último procedimento era feito apenas para verificar se o medo do braço aberto mantinha-se inalterado entre os grupos.

**Teste:** realizado 24 h ou 7 dias após o treino, consistia em recolocar o animal no braço fechado e medir o tempo que levava para sair desse compartimento (latência). Além disso, simultaneamente, era registrado o número de tentativas para entrar no braço aberto e esse parâmetro foi utilizado para o cálculo da avaliação de risco através da seguinte equação:  $[Risco = (N^{\circ} \text{ de tentativas} / \text{Latência}) \times 60]$ . Era considerada tentativa qualquer movimento com o corpo, imersões de cabeça ou colocar uma, duas ou três patas em um dos braços abertos seguido de retorno ao braço fechado. A equação representa, portanto, o número de vezes que o animal ameaçou sair do braço fechado (número de tentativas) e enquanto estava sendo avaliado no teste (latência), medidos em minutos ( $\times 60$ ). Logo após, o animal era recolocado em sua caixa por 30 s e, na sequência, colocado no braço aberto para o registro do tempo gasto pelo animal para entrar no braço fechado (fuga).

**Reteste:** Após a realização do teste, o animal era recolocado em sua caixa e, após um intervalo de 30 s, um segundo teste era realizado de forma idêntica ao

anterior. Assim, o animal era recolocado no braço fechado e novamente a latência de saída do braço e a avaliação de risco eram registradas.

A primeira abordagem de investigação envolveu o estudo do SR141716A, nas diferentes etapas do processo de memória: aquisição, consolidação e evocação.

Assim, inicialmente, avaliou-se o efeito do SR141716A (0,5; 1 e 2 mg/Kg) no desempenho dos animais no LTE, aplicando-se este antagonista 20 min antes dos treinos e avaliando o processo de aquisição no treinamento (número de treinos, latência total, aquisição da EI) e o desempenho dos animais nos testes/retestes 24 h depois (latência de saída do braço fechado e avaliação de risco).

A etapa seguinte dos experimentos no LTE consistia em verificar os efeitos da dose selecionada de SR141716A (1 mg/Kg) na consolidação da memória, administrando o SR141716A imediatamente após o treino e avaliando os testes/retestes 24 h e 7 dias após.

Para avaliação da influência do antagonista no processo de evocação da memória, os animais foram treinados até a aquisição da EI, como descrito anteriormente, no entanto, a administração do SR141716A (1 mg/Kg) foi realizada 24 h depois do treino, pouco antes do teste de memória.

Em outra etapa, foi avaliada a influência do SR141716A no déficit de memória causado por drogas amnésicas. Realizou-se uma curva dose-resposta do midazolam (0,5; 1,5; 2,5 e 3,0 mg/Kg), administrado 5 min antes dos treinos. A aquisição e o teste/reteste foram avaliados para escolha da dose amnésica. Assim, a administração de SR141716A (0,5; 1 e 2 mg/Kg) e midazolam (1,5 mg/Kg), 20 min e 5 min, respectivamente, antes dos treinos, foram realizados para avaliar o efeito do SR141716A no déficit de memória causado pelo midazolam. De modo similar, foi feita uma curva dose-resposta de escopolamina (0,1; 0,5 e 1 mg/Kg), administrada 30 min antes dos treinos, para escolha da dose amnésica. Assim, escopolamina (1 mg/Kg) e SR141716A (0,5; 1 e 2 mg/Kg) foram administrados

30 min e 20 min, respectivamente, antes dos treinos, para avaliar a eventual participação do SR141716A no déficit de memória causado pela escopolamina no LTE.

### **3.3.2 Labirinto em cruz elevado (*plus-maze*)**

Conforme mencionado anteriormente, o labirinto em cruz elevado (LCE) é um modelo proposto para estudo da ansiedade, em ratos, por Pellow *et al* (1985) e posteriormente validado por Lister (1987) para camundongos. O LCE para camundongos é formado por dois braços abertos (30x5 cm) e dois braços fechados (30x5x15 cm) opostos, estendidos a partir de uma plataforma central (5x5) e elevados 45 cm do nível do chão. Do mesmo modo que o LTE, possui uma proteção lateral de 0,25 cm para evitar a queda dos animais dos braços abertos e foi totalmente confeccionado em fórmica preta. Os testes com o LCE ocorreram em uma sala isolada, com temperatura mantida a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , iluminação vermelha de baixa intensidade (15W).

#### **3.3.2.1 Procedimentos**

Cada animal era colocado no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços abertos, permanecendo com livre acesso para explorar o aparelho por um período de 300 s. Após cada animal ser retirado, o aparelho era limpo com solução de etanol 10%.

Os principais parâmetros comportamentais avaliados foram a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos como medida de ansiedade. A frequência de entradas no braço fechado foi usada como parâmetro da atividade locomotora dos animais.

SR141716A (0,5; 1,0 e 2 mg/Kg) ou salina (NaCl 0,9 %) foram aplicados i.p. 20 min antes da exposição do animal ao LCE. Esse experimento foi usado para avaliar os possíveis efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos do SR141716A.

### **3.4 Análise estatística**

As comparações estatísticas entre as médias dos grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, com medidas repetidas, conforme o protocolo experimental. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si, empregando-se o teste LSD de Tukey. Os dados foram expressos com a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferenças estatisticamente significantes foi  $p \leq 0,05$ .

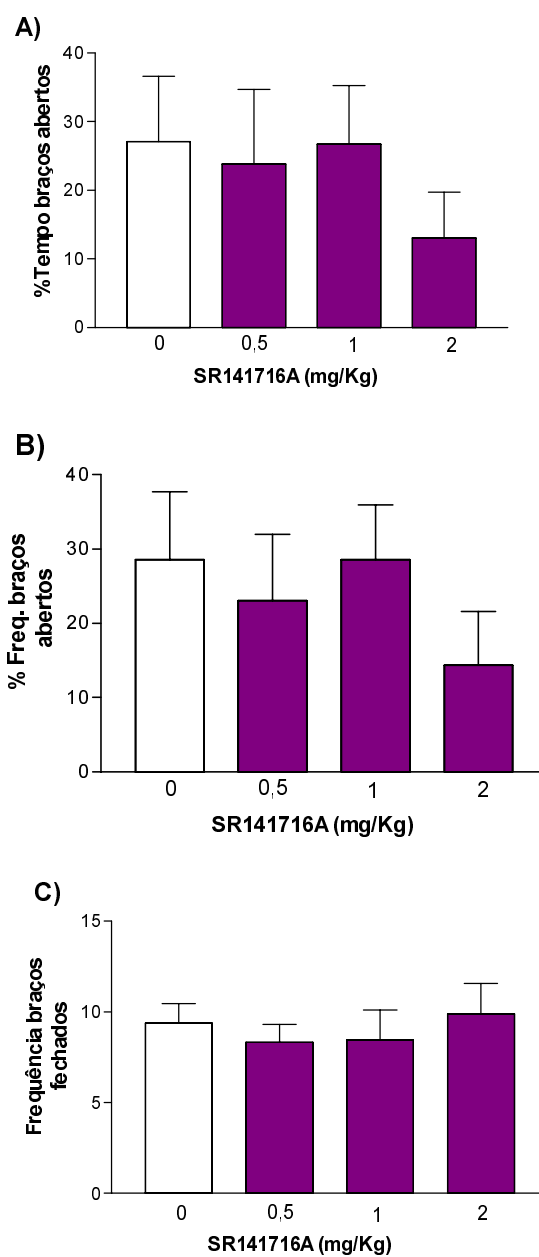
## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Experimento 1. Efeitos do SR141716A sobre as respostas comportamentais no LCE**

O experimento com o labirinto em cruz elevado (LCE) foi utilizado para avaliar possíveis efeitos do SR141716A na ansiedade em camundongos.

A Figura 2 (A,B,C) ilustra os efeitos do SR141716A, administrado 20 min antes da exposição dos animais ao LCE. A ANOVA de uma via não mostrou qualquer diferença significativa entre o grupo tratado e o grupo controle nos principais parâmetros medidos neste modelo. A frequência [ $F(3,31)=0,68$ ;  $p=0,5717$ ] e o percentual de tempo de permanência nos braços abertos [ $F(3,31)=0,54$ ;  $p=0,6570$ ] mostram que não houve uma indução ansiogênica ou ansiolítica pelo tratamento. Já a frequência de entradas nos braços fechados [ $F(3,31)=0,29$ ;  $p=0,8307$ ] indica que não houve alteração da atividade motora do animal. No entanto, apesar de não ser detectada uma tendência estatística, pode-se observar uma tendência ansiogênica aparente, induzida pelo SR141716A na dose de 2 mg/Kg.





**Figura 2** - *Efeito do SR141716A no LCE. (A):* Efeito no % do tempo de permanência dos animais nos braços abertos. **(B):** Efeito no % da frequência (nº de entradas) no braço aberto. **(C):** Efeito na frequência de entradas nos braços fechados. SR141716A ou salina foram administrados 20 min antes da exposição ao LCE. As barras representam a média  $\pm$ E.P.M (9-10 animais) dos parâmetros medidos no LCE por 5 min.

#### **4.2 Experimento 2. Efeitos do SR141716A sobre a aquisição, e recuperação após 24 h, da resposta de EI no LTE**

Os efeitos da administração i.p. do antagonista canabinóide SR141716A (0,5; 1 e 2 mg/Kg) 20 min antes dos treinos no LTE sobre a aquisição, e recuperação após 24 h, da resposta de EI no LTE, estão ilustrados nas Figuras 3 (A,B) e 4 (A,B).

Os resultados mostram que, após os treinos, 100% dos animais apresentaram aquisição da EI, alcançando o critério de 300 s de permanência no braço fechado do LTE. A análise efetuada com a ANOVA de uma via não revelou efeito significativo do SR141716A no número de treinamentos necessários para a aquisição da EI [ $F(3,38)=0,92$ ;  $p=0,4425$ ] (Figura 3A).

As latências das saídas dos braços fechados foram registradas e somadas no decorrer dos treinos. A ANOVA realizada na latência total dos treinos não apresentou qualquer alteração entre os grupos [ $F(3,38)=0,15$ ;  $p=0,9279$ ] (Figura 3B). Esses dados mostram que os camundongos adquiriram a EI e que não foram detectados alteração, nos parâmetros de aprendizagem ou de atividade motora medidos no LTE. Trinta segundos após a aquisição da EI no treino, foi registrado o tempo de saída dos animais dos braços abertos. Neste experimento, e em todos os demais, a ANOVA não apresentou qualquer alteração entre os grupos (dados não apresentados). Esse fato sugere que as drogas estudadas no presente trabalho não alteraram o medo incondicionado do braço aberto.

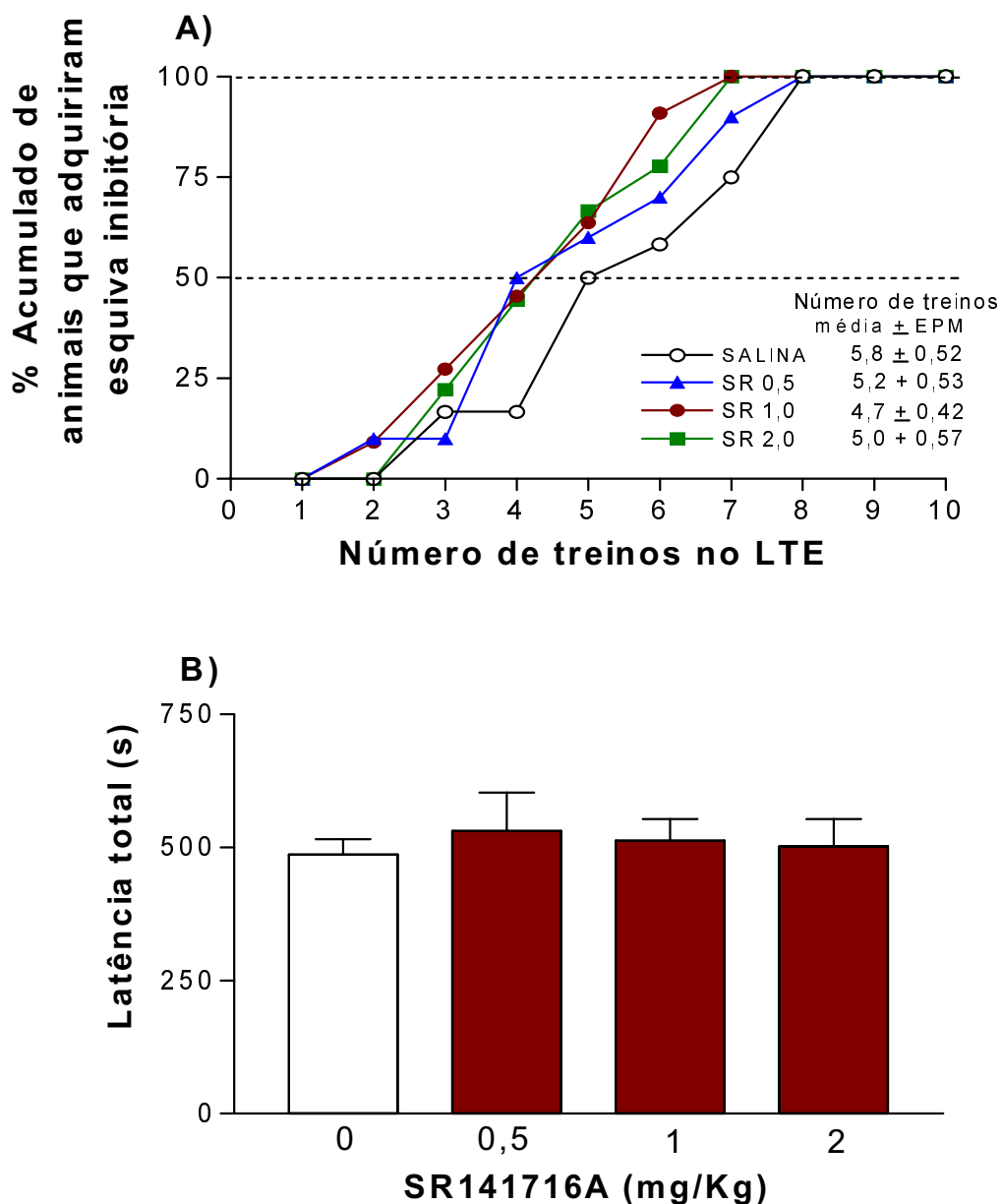
No teste e no reteste da latência de saída do braço fechado, realizado 24 h após o treino (Figura 4A), a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator tratamento [ $F(3,38)=3,25$ ;  $p<0,0323$ ], e do fator teste/reteste [ $F(1,38)=26,51$ ;  $p<0,0001$ ], porém não apresentou diferença significativa para a interação entre estes fatores [ $F(3,38)=1,33$ ;  $P=0,2789$ ]. No teste, a análise *post hoc* mostrou que, somente na dose de 1 mg/Kg de SR141716A, a latência da EI do grupo tratado foi significativamente mais elevada do que a do grupo salina.

Esses dados indicam que o SR141716A (1 mg/Kg) melhora as respostas dos animais no teste, sugerindo um melhor desempenho da memória.

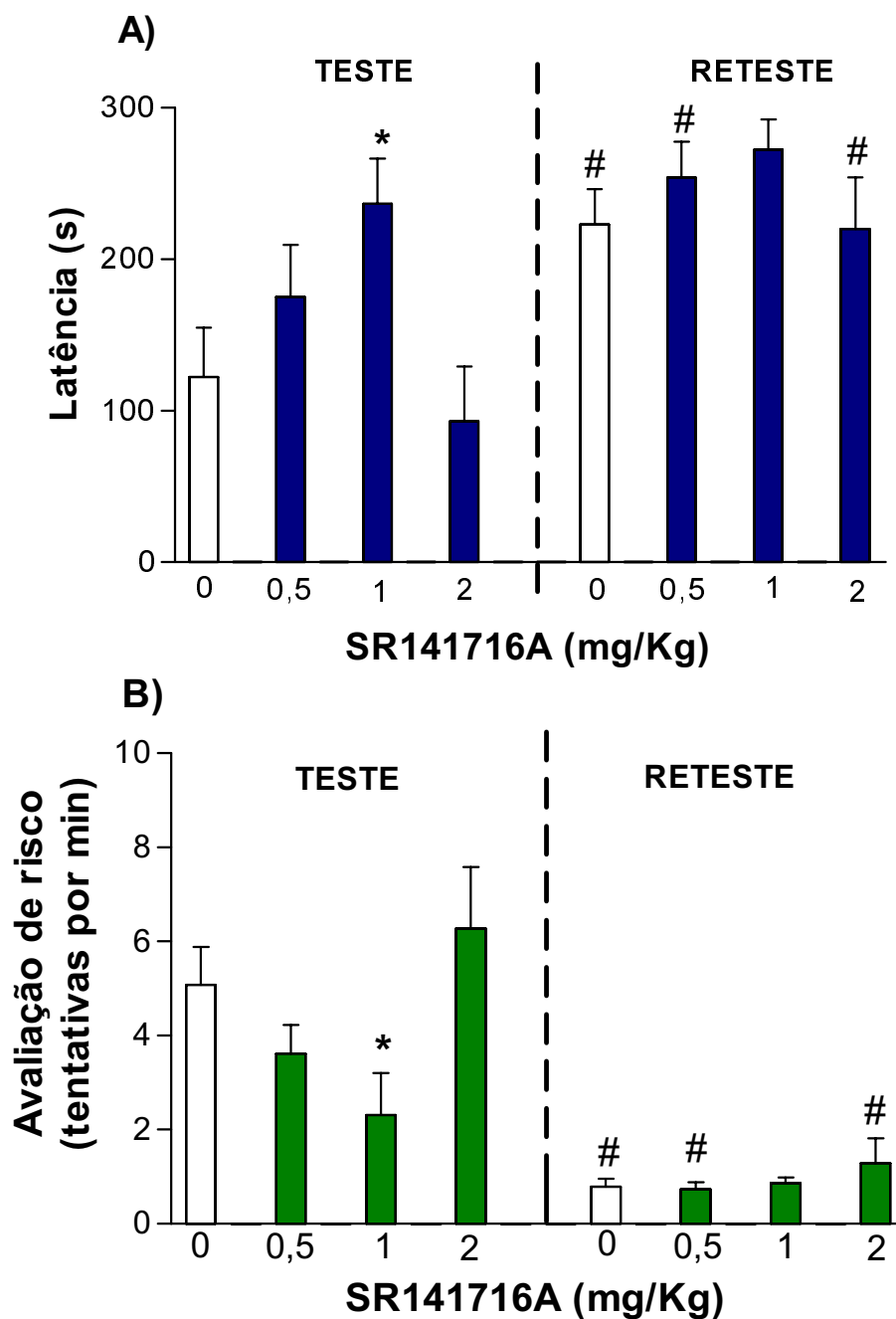
Em relação aos dados de latência no reteste, as comparações *post hoc* com os respectivos grupos na etapa de teste revelaram um aumento significativo no tempo de todos os grupos, com exceção do grupo SR141716A (1 mg/Kg). Este resultado possivelmente ocorre pelo fato do grupo SR141716A (1 mg/Kg) já apresentar uma resposta de EI elevada no teste. Esses dados sugerem que após a primeira exposição ao LTE, teste, os animais apresentam elevada EI na segunda exposição, reteste (Figura 4A).

A análise de variância para a avaliação de risco (Figura 4B) revelou efeito significativo do fator tratamento [ $F(3,38)=3,05$ ;  $p<0,0404$ ], do fator teste/reteste [ $F(1,38)= 67,76$ ;  $p<0,0001$ ] e na interação entre estes fatores [ $F(3,38)= 3,59$ ,  $p<0,0222$ ]. A análise *post hoc* demonstrou que, no teste, houve uma diminuição significativa da avaliação de risco, no grupo tratado com SR141716A (1 mg/Kg). Esse resultado reflete uma redução na esquivas ao braço aberto, sugerindo um melhor desempenho dos animais tratados com esta dose no teste.

As comparações *post hoc* efetuadas com as médias da avaliação de risco no reteste, mostraram uma redução significativa destes parâmetro em todos os grupos, exceto o grupo SR141716A (1 mg/Kg). Em suma, estes resultados apresentam um perfil de significância estatística similar ao verificado para as latências e possivelmente constituem medidas complementares.



**Figura 3** - Efeito do SR141716A na aquisição da EI. **(A):** Percentual acumulado de animais que adquiriram (EI) no decorrer dos treinos e a média  $\pm$  EPM de treinos necessários para alcançar a EI em cada grupo. **(B):** As barras representam a média  $\pm$  EPM (9-12 animais) da somatória das latências ao longo dos treinos. Salina ou SR141716A (0,5; 1 e 2 mg/Kg) foram administrados 20 min antes do treino no LTE.



**Figura 4** - Efeito do SR141716A na latência de saída no LTE e na avaliação de risco 24 h após o treino. Salina ou SR141716A foram administrados 20 min antes dos treinos. O teste e o reteste (30 s de intervalo) foram realizados medindo: **(A)**: latência de saída do braço fechado em (s) e **(B)**: avaliação de risco. As barras representam a média  $\pm$  EPM (9-12 animais). \*: diferença significativa em relação ao grupo salina. #: diferença significativa em relação ao respectivo grupo teste. (Teste LSD,  $p < 0,05$ ).

### **4.3 Experimento 3. Efeitos do SR141716A sobre a consolidação da resposta de EI, 24 h, e 7 dias, após o treino no LTE**

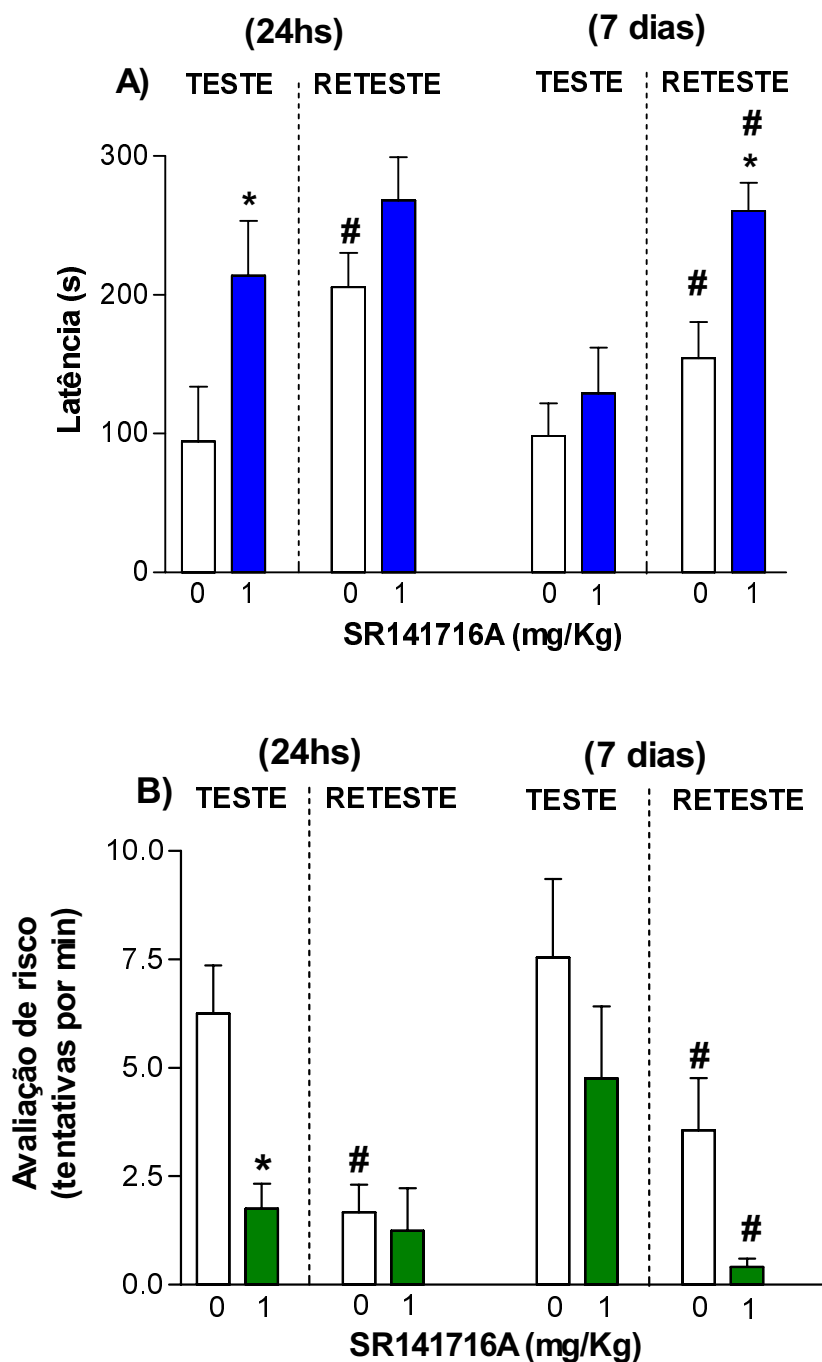
Os efeitos do antagonista canabinóide SR141716A (1mg/Kg), administrado imediatamente após o treino, foram avaliados no LTE 24 h e 7 dias após o treino, como mostra a Figura 5 (A,B). Esta dose foi selecionada dos experimentos prévios.

A ANOVA sobre os dados da latência no teste apresentou efeito significativo no tratamento [ $F(1,18)=4,90$ ;  $p<0,0400$ ], no fator teste/reteste [ $F(1,18)=6,61$ ;  $p<0,0192$ ], mas não apresentou diferença na interação entre estes fatores [ $F(1,18)=0,79$ ;  $p=0,3855$ ]. Na análise do comportamento de risco, a ANOVA detectou efeito significativo no tratamento [ $F(1,18)=7,14$ ;  $p<0,0156$ ], no fator teste/reteste [ $F(1,18)=9,41$ ;  $p<0,0066$ ] e na interação tratamento x teste/reteste [ $F(1,18)=6,04$ ;  $p<0,0244$ ]. As comparações *post hoc* evidenciaram significativo efeito na maior latência da EI e na redução da avaliação de risco do grupo SR141716A em relação ao grupo salina, sugerindo um melhor desempenho da memória do grupo tratado. No reteste, 30 s após o teste, não houve diferença entre o grupo tratado e o grupo controle, tanto para a latência quanto para a avaliação de risco no teste de 24h (Figura 5 A,B).

Ao se efetuar o teste 7 dias após o treino, a ANOVA detectou, nos dados da latência, significativo efeito no tratamento [ $F(1,18)=4,62$ ;  $p<0,0455$ ], no fator teste/reteste [ $F(1,18)=23,91$ ;  $p<0,0001$ ] e ausência de diferença na interação destes fatores [ $F(1,18)=3,84$ ;  $p=0,0657$ ]. A análise *post hoc* não foi capaz de detectar diferenças nas latências entre os grupos no teste, no entanto, houve diferença significativa, no reteste, onde o grupo SR141716A (1 mg/Kg) apresentou um aumento significativo da EI. Esse resultado sugere que, mesmo após o período de uma semana, o reteste mostrou-se sensível ao antagonista. Quanto à análise *post hoc* dos resultados da avaliação de risco, somente no fator teste/reteste foi observado um efeito significativo [ $F(1,18)=12,60$ ;  $p<0,0023$ ], não

apresentando efeito significativo no fator tratamento [ $F(1,18)=3,27$ ;  $p=0,0871$ ] e na interação dos fatores [ $F(1,18)=0,02$ ;  $p=0,877$ ].

Os resultados indicam um melhor desempenho na resposta de esquiva do grupo SR141716A (1mg/Kg), sugerindo uma interferência deste antagonista canabinóide no processo de consolidação da memória, já que a administração foi realizada somente após os treinamentos.



**Figura 5** - Efeito do SR141716A (1 mg/Kg), administrado logo após o treino, na latência de saída e na avaliação de risco 24 h, e 7 dias, após o treino no LTE. O teste e o reteste (30s de intervalo) foram realizados medindo: **(A)**: latência de saída do braço fechado em (s) e **(B)**: avaliação de risco. As barras representam a média  $\pm$  EPM (9-11 animais). \*: diferença significativa em relação ao respectivo grupo salina. #: diferença significativa em relação ao respectivo grupo teste. (Teste LSD,  $p < 0,05$ ).



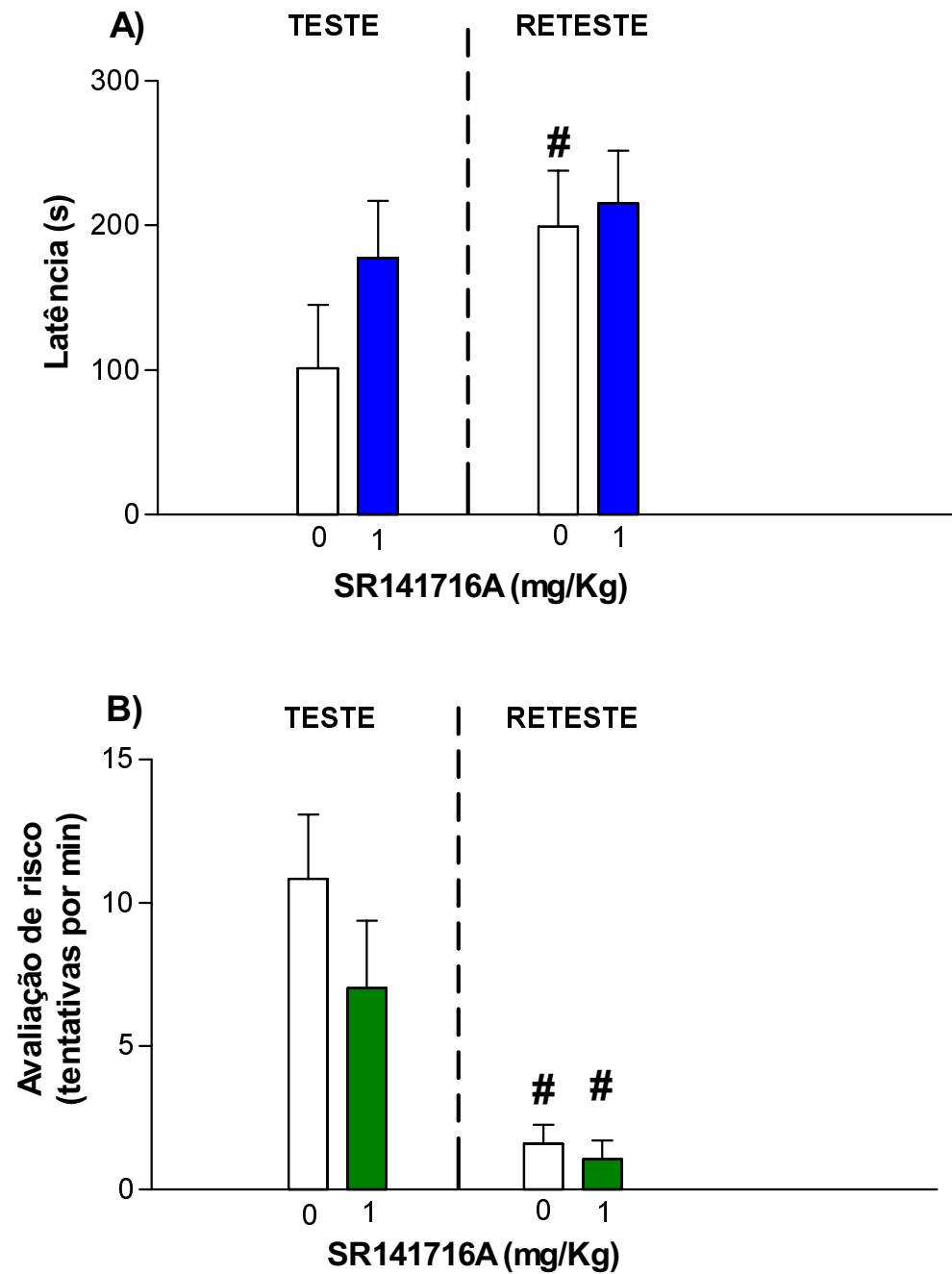
#### **4.4 Experimento 4. Efeitos do SR141716A sobre a evocação da resposta de EI, 24 h após o treino no LTE**

A Figura 6 (A,B) mostra o efeito do SR141716A (1 mg/Kg), administrado 20 min antes do teste e do reteste, na latência de saída e na avaliação de risco no LTE, 24 h após o treinamento.

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas efetuada nos dados de latência não detectou efeito significativo do tratamento [ $F(1,20)=0,95$ ;  $p=0,3412$ ] ou da interação tratamento x teste/reteste [ $F(1,20)=0,98$ ;  $p=0,333$ ], apresentando significância somente no fator teste/reteste [ $F(1,20)=5,03$ ;  $p<0,0365$ ]. Do mesmo modo, para a avaliação de risco a ANOVA não revelou efeito no tratamento [ $F(1,20)=0,09$ ;  $p=0,766$ ] ou na interação tratamento x teste/reteste [ $F(1,20)=0,001$ ;  $p=0,9936$ ], apresentando efeito significativo somente no fator teste/reteste [ $F(1,20)=18,26$ ;  $p=0,0004$ ].

Apesar de a ANOVA não mostrar resultados estatísticos significantes, observa-se uma tendência aparente do grupo SR141716A em apresentar uma maior latência e menor avaliação de risco que o grupo salina.

Esses resultados sugerem que o SR141716A, na dose de 1 mg/Kg, não alterou o processo de evocação de memória neste modelo experimental.



**Figura 6** - Efeito do SR141716A (1 mg/Kg), administrado 20 min antes do teste, na latência de saída e na avaliação de risco, 24 h após o treino no LTE. O teste e o reteste (30 s de intervalo) foram realizados medindo: **(A)**: latência de saída do braço fechado em (s) e **(B)**: avaliação de risco. As barras representam a média  $\pm$  EPM (9-11 animais). #: diferença significativa em relação ao respectivo grupo teste. (Teste LSD,  $p < 0,05$ ).

#### **4.5 Experimento 5. Efeitos da escopolamina sobre a resposta de EI, na aquisição e 24 h após o treino no LTE**

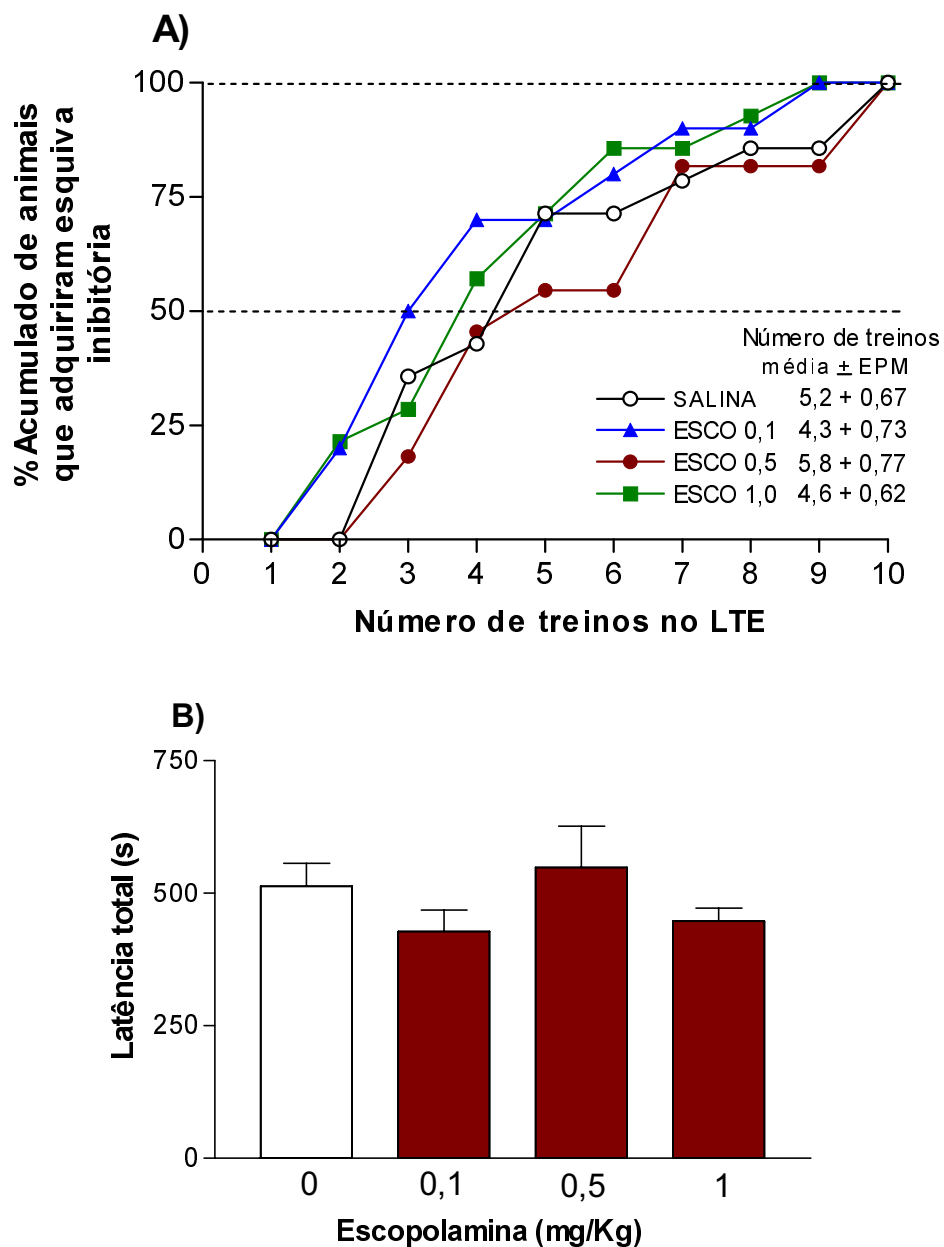
As Figuras 7 (A,B) e 8 (A,B) ilustram os efeitos da escopolamina (ESCO) (0,1; 0,5 e 1 mg/Kg) administrada 30 min antes do treino, na aquisição e, após 24 h, na recuperação da EI no LTE.

A ANOVA de uma via mostrou que entre os grupos, no treinamento, não houve diferença significativa do número de treinos [ $F(3,45)=0,86$ ;  $p=0,4707$ ] e da latência total dos treinos [ $F(3,45)=1,30$ ;  $p=0,2853$ ] para aquisição da EI. Esses dados sugerem que, através dos parâmetros avaliados, não foi detectado prejuízo na aquisição da EI no LTE (Figura 7 A,B).

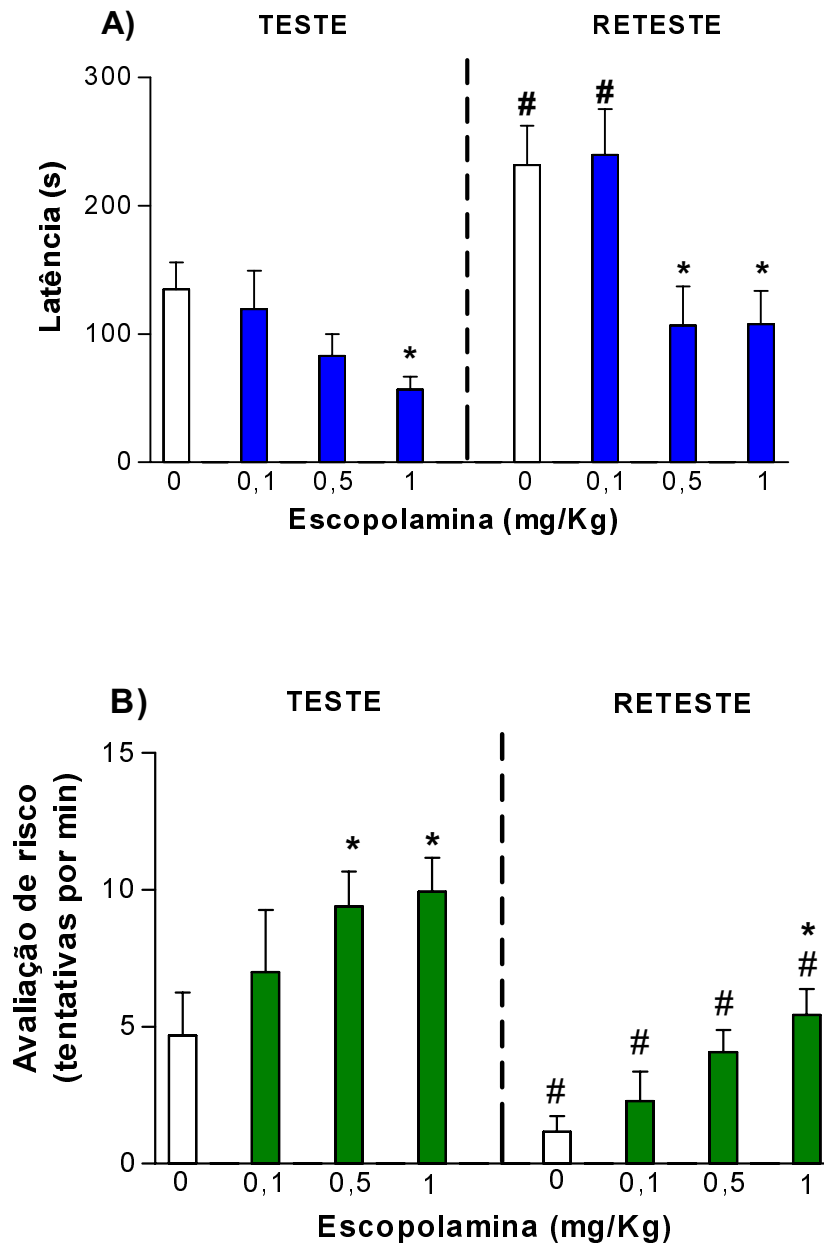
A ANOVA de duas vias, efetuada sobre os dados das latências, revelou efeito significativo do fator tratamento [ $F(3,45)=6,73$ ;  $p<0,0008$ ], do fator teste/reteste [ $F(1,45)=25,62$ ;  $p<0,0001$ ] e não apresentou diferença significativa na interação entre tratamento e teste/reteste [ $F(3,45)=2,14$ ;  $p=0,1084$ ].

De modo similar, a ANOVA para avaliação de risco apresentou efeito significativo no tratamento [ $F(3,45)=4,61$ ;  $p<0,0068$ ] e no fator teste/reteste [ $F(1,45)=25,62$ ;  $p<0,0001$ ] e não apresentou diferença entre esses dois fatores [ $F(3,45)=0,21$ ;  $p<0,8887$ ].

Os resultados dos testes *post hoc* mostram que o grupo ESCO (1 mg/Kg) apresentou redução da latência de saída do braço fechado e aumento da avaliação de risco em comparação com o grupo salina, tanto no teste como no reteste. Esses dados sugerem um efeito amnésico do tratamento.



**Figura 7** - Efeito da escopolamina na aquisição da EI no LTE. **(A)**: Ilustra o percentual acumulado de animais que adquiriram a EI no decorrer dos treinos e a média  $\pm$  EPM de treinos necessários para alcançar a EI em cada grupo. Salina (0) ou escopolamina (ESCO) foram administrados i.p. 30 min antes do treino. **(B)**: As barras representam a média  $\pm$  EPM (10-14 animais) da somatória das latências ao longo dos treinos.



**Figura 8** - Efeito da escopolamina na latência de saída e na avaliação de risco 24 h após o treino no LTE. Salina (0) ou escopolamina (0,1; 0,5; 1 mg/Kg) foram administrados 30 min antes dos treinos. O teste e o reteste (30 s de intervalo) foram realizados medindo: **(A)**: latência de saída do braço fechado em (s) e **(B)**: avaliação de risco. As barras representam a média  $\pm$  EPM (10-14 animais). \*: diferença significativa em relação ao grupo salina. #: diferença significativa em relação ao respectivo grupo teste. ( $p < 0,05$ ).

#### **4.6 Experimento 6. Influência do SR141716A sobre os efeitos da escopolamina, na aquisição e 24 h após o treino no LTE**

A influência da administração do antagonista canabinóide SR141716A (0,5; 1; e 2 mg/Kg), administrado 20 min antes dos treinos, sobre o efeito da diminuição da resposta de EI da escopolamina (1,0 mg/Kg), administrada 30 min antes do treino no LTE, está representada nas Figuras 9 (A,B) e 10 (A,B).

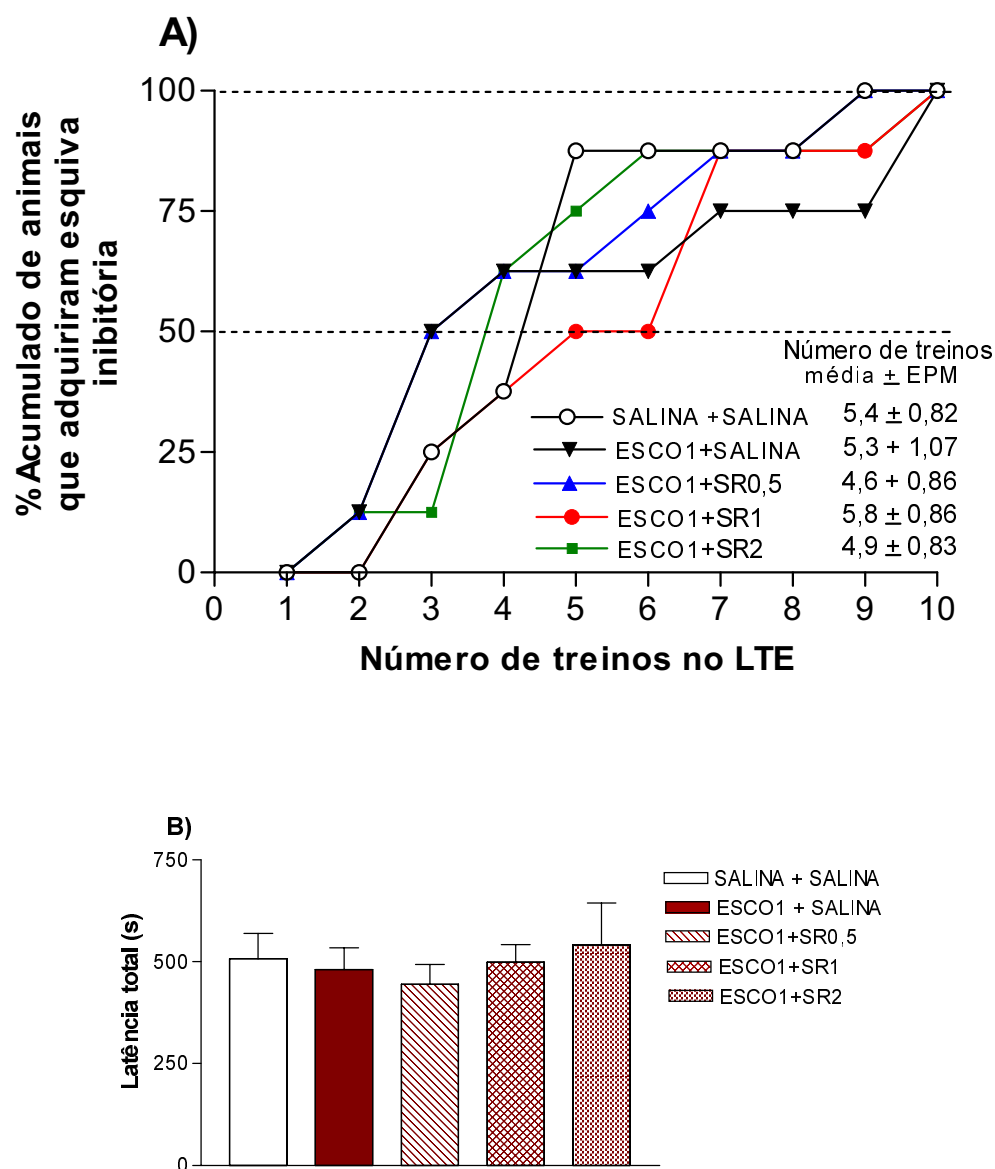
A ANOVA de uma via efetuada sobre estes dados mostram que não houve alteração em relação ao número de treinos [ $F(4,35)=0,27$ ;  $p=0,8923$ ] e na latência total dos treinos [ $F(4,35)=0,29$ ;  $p=0,8803$ ] para aquisição da EI em todos os grupos. Estes resultados sugerem que o tratamento não alterou o aprendizado dos animais, ao menos nestes parâmetros analisados no LTE (Figura 9 A,B).

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas realizadas sobre os dados da latência apresentou, na fase de teste, um significativo efeito do fator tratamento [ $F(4,35)=2,68$ ;  $p<0,0476$ ] e do fator teste/reteste [ $F(1,35)=52,85$ ;  $p<0,0001$ ], não havendo diferença na interação entre o tratamento e o teste/reteste [ $F(4,35)=1,02$ ;  $p=0,4125$ ]. As comparações *post hoc* sobre estas medidas obtidas nos direntes grupos revelaram que a redução na latência do grupo ESCO (1 mg/Kg) é significativamente diferente do grupo salina, tanto na etapa de teste, como no reteste, sugerindo, assim, um efeito amnésico da ESCO no LTE (Figura 10A). Quando as comparações envolveram os grupos ESCO + SR141716A, fase teste, foi observado que somente na associação com a dose de 1 mg/Kg do antagonista canabinóide o aumento da esQUIVA foi estatisticamente diferente do grupo ESCO+salina. Nos experimentos anteriores com SR141716A, esta dose foi a que produziu um efeito *per se* na memória de camundongos avaliados no LTE. No reteste, todos os grupos ESCO + SR141716A apresentaram maior latência em relação ao grupo ESCO. Estes dados sugerem que o SR141716A (1 mg/Kg) atenua o prejuízo na esQUIVA induzida em animais tratados com ESCO.

A ANOVA efetuada sobre os dados de avaliação de risco mostrou efeito significativo no tratamento [ $F(4,35)=4,11$ ;  $p<0,0078$ ], no fator teste/reteste [ $F(1,35)=49,25$ ;  $p<0,0001$ ], e não apresentando significância no fator interação, [ $F(4,35)=1,02$ ;  $p=0,4116$ ].

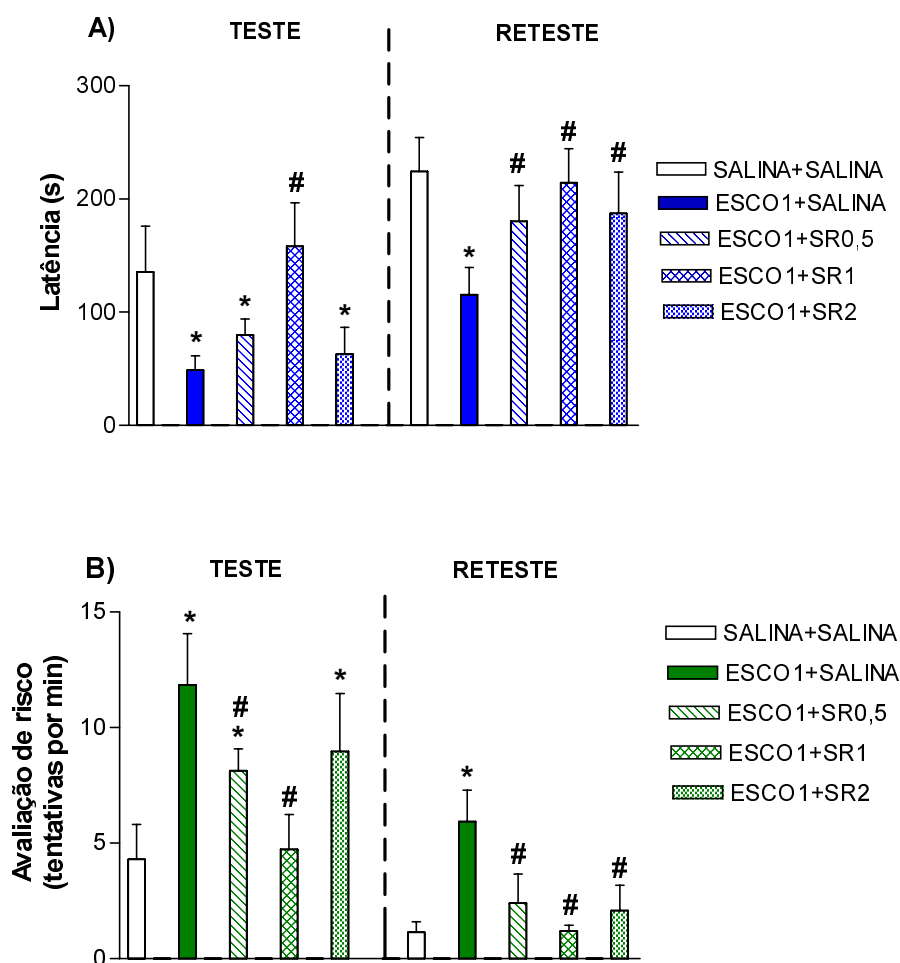
A análise *post hoc* revelou que o grupo ESCO + salina apresentou um índice maior de risco, comparado ao grupo salina, tanto no teste, como no reteste, sugerindo que os animais injetados com ESCO apresentaram uma menor resposta de esquiva ao braço aberto do LTE, isto é, “arriscando-se” mais (Figura 10B). Além disso, as demais comparações entre o grupo ESCO + SR141716A com o grupo ESCO + salina evidenciaram uma significativa atenuação dos índices de risco no primeiro grupo, particularmente nas associações com o SR141716A nas doses 0,5 e 1 mg/Kg, teste, e com todas as doses no reteste (Figura 10B).

Tomando em conjunto, estes dados da latência e da avaliação de risco sugerem que o SR141716A (1 mg/Kg) atenua o efeito amnésico da ESCO em camundongos neste modelo.



**Figura 9** -Influência do SR141716A sobre o efeito da escopolamina na aquisição da EI no LTE. **(A):** Percentual acumulado de animais que adquiriram a EI no decorrer dos treinos e a média  $\pm$  EPM de treinos necessários para alcançar a EI em cada grupo. Escopolamina 1 mg/Kg (ESCO1) e SR141716A (0,5; 1 e 2 mg/Kg) foram administrados i.p. 30 e 20 min, respectivamente, antes do treino. **(B):** As barras representam a média  $\pm$  EPM (8 animais) da somatória das latências ao longo dos treinos.





**Figura 10** - *Influência do SR141716A no efeito da escopolamina (1 mg/Kg) na latência de saída e na avaliação de risco 24 h após o treino no LTE.* Escopolamina e SR141716A foram administrados 30 e 20 min, respectivamente, antes dos treinos. O teste e o reteste (30 s de intervalo) foram realizados medindo: **(A)**: latência de saída do braço fechado em (s) e **(B)**: avaliação de risco. As barras representam a média  $\pm$  EPM (8 animais). \*: diferença significativa em relação ao respectivo grupo salina. #: diferença significativa em relação ao respectivo grupo esco + salina. (Teste LSD,  $p < 0,05$ ).

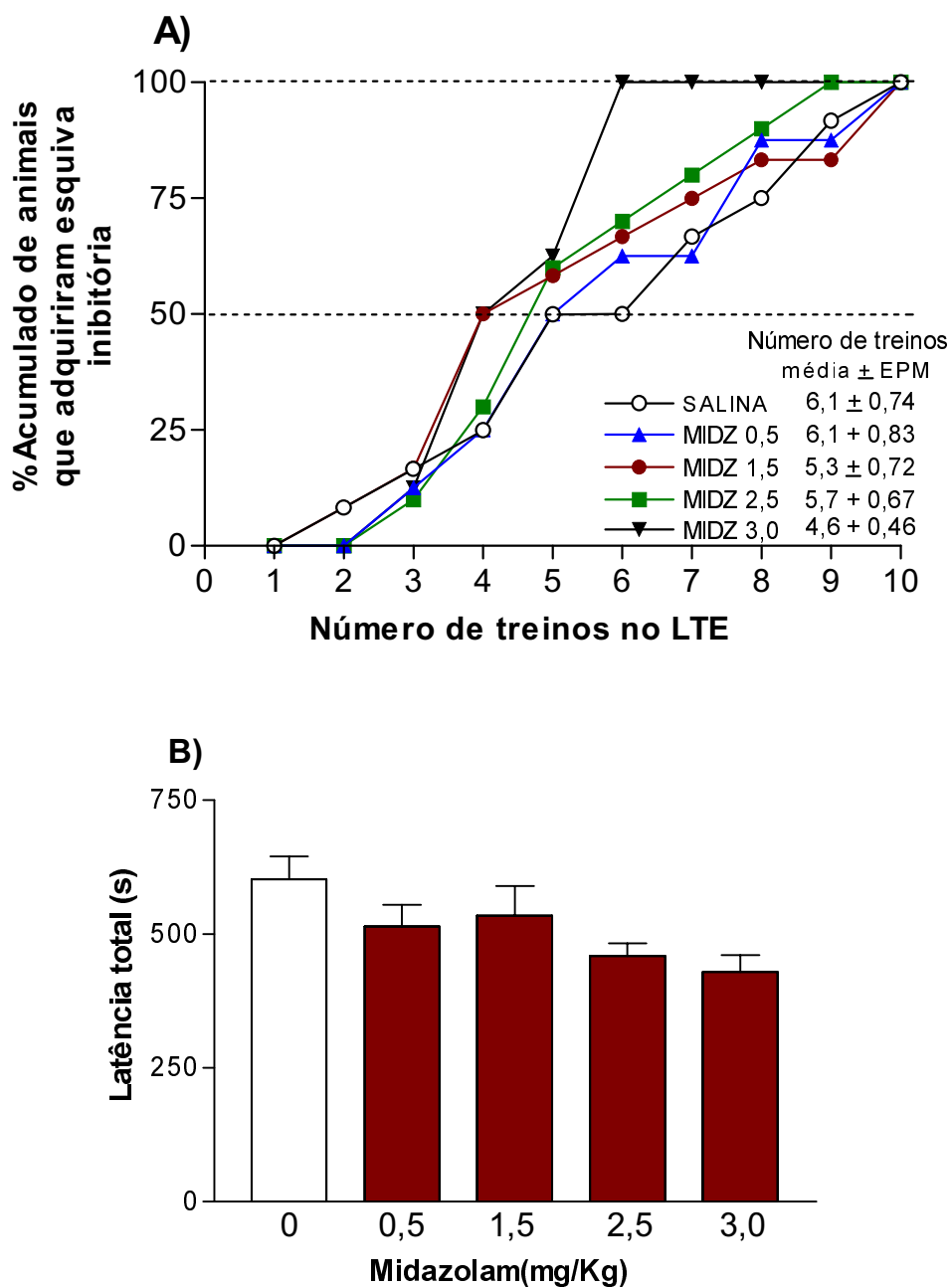
#### **4.7 Experimento 7. Efeitos do midazolam sobre a resposta de EI, na aquisição e 24 h após o treino no LTE**

As Figuras 11 (A,B) e 12 (A,B) representam os resultados dos efeitos do benzodiazepínico midazolam (MDZ) (0,5; 1,5; 2,5; e 3,0 mg/Kg), administrado 5 min antes do treino, e avaliado 24 h depois no LTE.

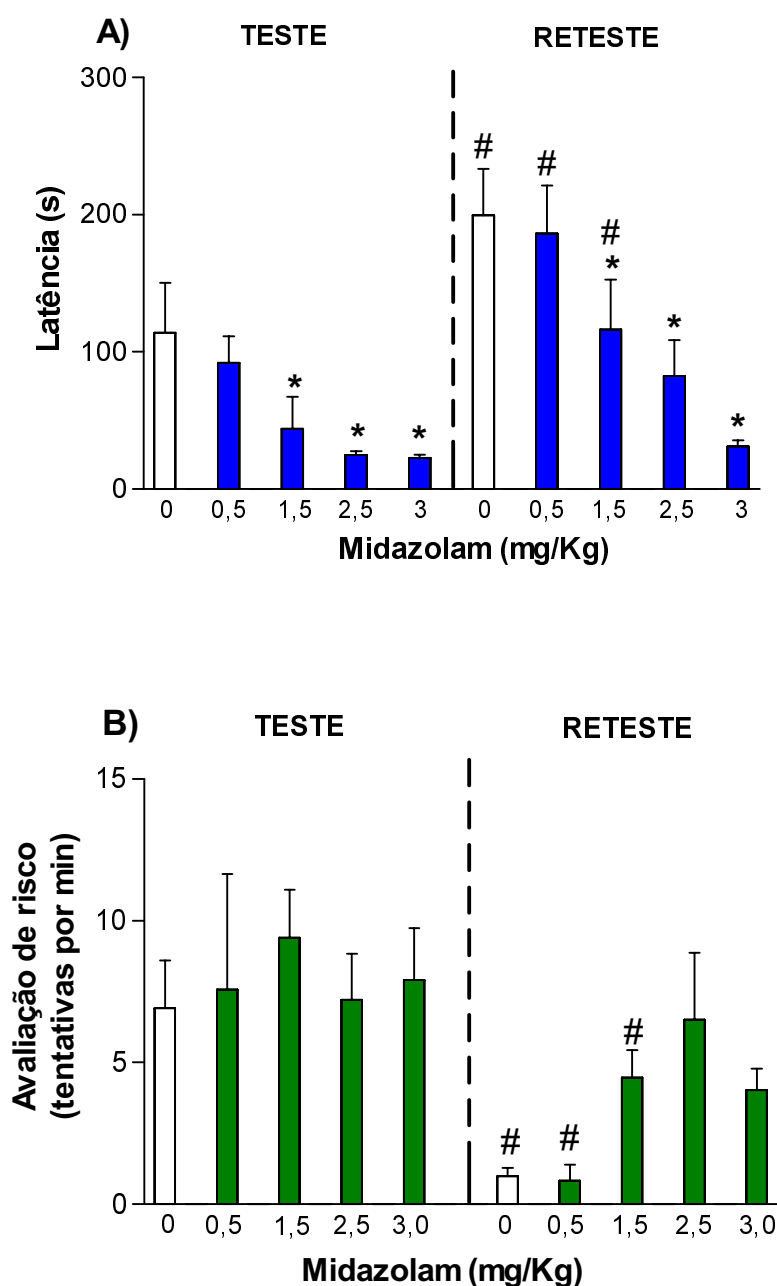
Todos os grupos adquiriram a EI no treinamento (Figura 11A). A ANOVA de uma via efetuada sobre o número de treinos revelou que não houve diferença significativa neste fator [ $F(4,45)=0,71$ ;  $p=0,5892$ ]. Do mesmo modo, a ANOVA de uma via realizada com os dados de latência mostrou ausência de diferenças significantes nestas medidas [ $F(4,45)=1,65$ ;  $p=0,1785$ ] (Figura 11B). Apesar disso, a dose mais elevada de MDZ apresentou uma tendência aparente em reduzir a média da latência total, sugerindo um efeito sedativo.

A análise realizada com a ANOVA de 2 vias com medidas repetidas envolvendo as latências no teste/reteste 24 h após o treino, mostrou efeito significativo do tratamento [ $F(4,45)=5,29$ ;  $p<0,0014$ ] e do fator teste/reteste [ $F(1,45)=20,07$ ;  $p<0,0001$ ], e ausência de efeito significativo na interação destes fatores [ $F(4,45)=99$ ;  $p=0,4249$ ]. A análise *post hoc* revelou que o MDZ (1,5; 2,5 e 3,0 mg/Kg) diminuiu, de maneira estatisticamente significativa, a latência de saída do braço fechado em relação ao grupo controle nas etapas de teste e reteste (Figura 12A).

A ANOVA sobre os dados de avaliação de risco detectou diferença significativa somente para o fator teste/reteste [ $F(1,45)=17,24$ ;  $p<0,0001$ ], enquanto que o tratamento [ $F(4,45)=1,24$ ;  $p=0,3086$ ] e a interação entre ambos os fatores [ $F(4,45)=0,97$ ;  $p=0,4357$ ] não revelaram significância. Esses resultados sugerem que os animais injetados com MDZ não apresentaram alteração avaliação de risco, apesar do déficit apresentado na latência de saída do braço fechado.



**Figura 11** – Efeito do midazolam na aquisição da EI no LTE. **(A):** Ilustra o percentual acumulado de animais que adquiriram EI no decorrer dos treinos e a média  $\pm$  EPM de treinos necessários para alcançar a EI em cada grupo. Salina ou midazolam (MDZ) foram administrados i.p. 5 min antes do treino. **(B):** As barras representam a média  $\pm$  EPM (8-12 animais) da somatória das latências ao longo dos treinos.



**Figura 12** - Efeito do midazolam na latência de saída e na avaliação de risco 24 h após o treino no LTE. Salina (0) ou midazolam (0,5; 1,5; 2,5; 3,0 mg/K) foram administrados 5 min antes dos treinos no LTE. O teste e o reteste (30 s de intervalo) foram realizados medindo: **(A)** latência de saída do braço fechado em (s) e **(B)**: avaliação de risco. As barras representam a média  $\pm$  EPM (8-12 animais). \*: diferença significativa em relação ao grupo salina. #: diferença significativa em relação ao respectivo grupo teste. (Teste LSD,  $p < 0,05$ ).

#### **4.8 Experimento 8. Influência do SR141716A sobre os efeitos do midazolam, na aquisição e 24 h após o treino no LTE**

Os resultados da influência do pré-tratamento do SR141716A (0,5; 1; e 2 mg/Kg) no efeito do MDZ (1,5 mg/Kg), administrados 20 min e 5 min, respectivamente, antes do treino no LTE, podem ser observados nas Figuras 13 (A,B) e 14 (A,B).

A ANOVA de uma via não detectou qualquer diferença significativa no número de treinos entre os grupos [ $F(4,50)=0,49$ ;  $p=0,7442$ ] ou na latência total dos treinos [ $F(4,50)=0,37$ ;  $p=0,8299$ ] para aquisição da EI. Esses dados demonstram que todos os grupos adquiriram EI, neste modelo.

A ANOVA de duas vias, das latências no teste, apresentou efeito significativo no fator tratamento [ $F(4,50)=3,49$ ;  $p<0,0138$ ] e do fator teste/reteste [ $F(1,50)=40,93$ ;  $p<0,0001$ ], não apresentando significância na interação tratamento x teste/reteste [ $F(4,50)=0,41$ ;  $p=0,8013$ ].

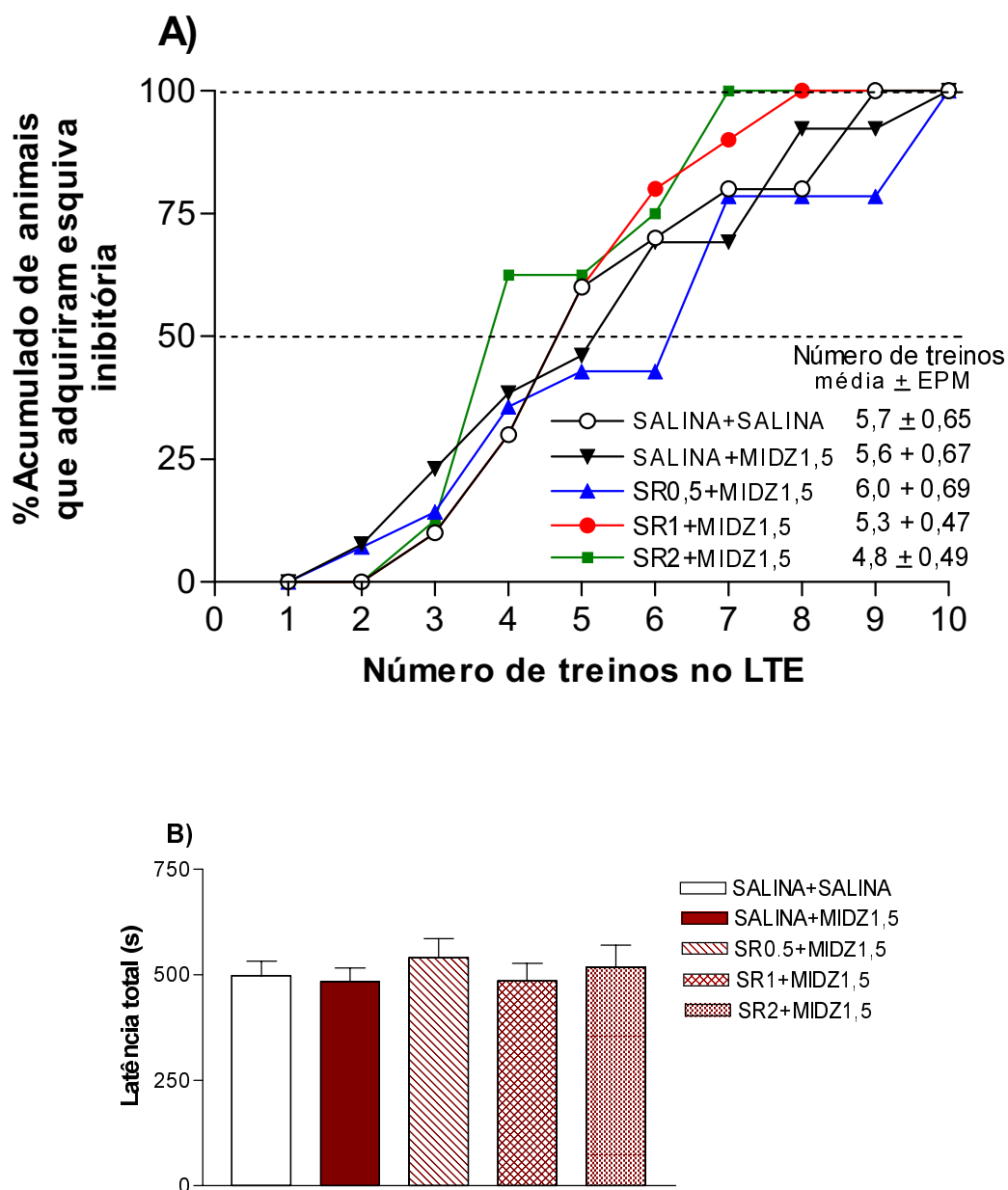
A análise *post hoc* destes dados de latência revelou que todos os grupos injetados com MDZ, associados ou não com o SR141716A, apresentaram significativa redução na latência, tanto no teste como no reteste, exceto o grupo tratado com MDZ + SR141716A (0,5 mg/Kg) (Figura 14A).

Assim, os resultados acima sugerem que o SR141716A não atenuou os efeitos amnésicos do MDZ.

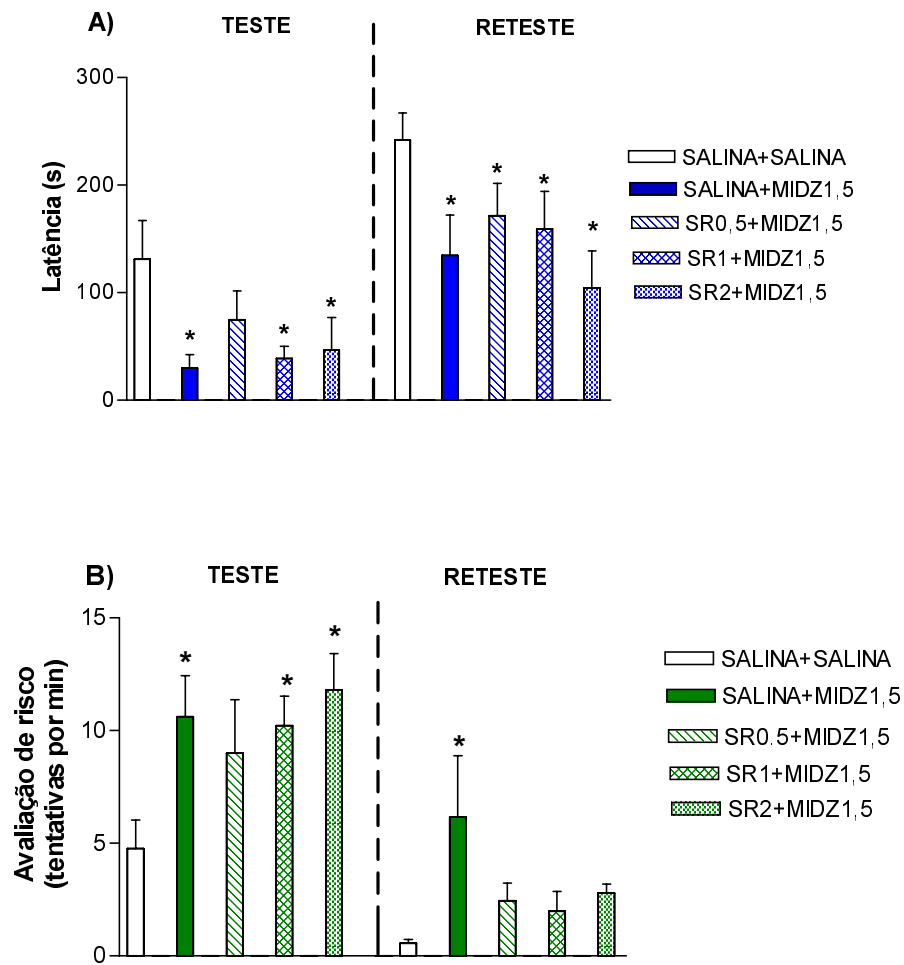
A ANOVA para avaliação de risco mostrou efeito significativo no tratamento [ $F(4,50)=2,71$ ;  $p<0,0403$ ], no fator teste/reteste [ $F(1,50)=30,62$ ;  $p<0,0001$ ] e não apresentou significância na interação entre ambos [ $F(4,50)=0,64$ ;  $p=0,6378$ ]. A análise *post hoc* dos dados envolvendo a avaliação de risco evidenciou que, independente da associação com o antagonista canabinóide, todos os grupos injetados com MDZ apresentaram, na fase teste, uma maior avaliação de risco em comparação com o grupo salina, exceto o grupo MDZ + SR141716A (0,5 mg/Kg). Curiosamente, no reteste, somente o grupo tratado com MDZ

manteve um significativo índice de risco em comparação com o grupo salina (Figura 14B).

Em suma, o conjunto dos resultados envolvendo a injeção de benzodiazepínico sugerem que o conhecido efeito amnésico do MDZ não foi afetado pelo pré-tratamento com o SR141716A neste modelo.



**Figura 13** – *Influência do SR141716A sobre os efeitos do midazolam na aquisição da EI, número de treinos e latência total no LTE. (A):* Ilustra o percentual acumulado de animais que adquiriram EI no decorrer dos treinos e a média  $\pm$  EPM de treinos necessários para alcançar a EI em cada grupo. SR141716A (0,5; 1 e 2 mg/Kg) e midazolam 1,5 mg/Kg (MDZ 1,5) foram administrados i.p. 20 e 5 min, respectivamente, antes do treino, no LTE **(B):** As barras representam a média  $\pm$  EPM (8-12 animais) da somatória das latências ao longo dos treinos.



**Figura 14** - Influência do SR141716A no efeito do midazolam (1,5 mg/Kg) na latência de saída e na avaliação de risco 24 h após o treino no LTE. SR141716A e midazolam foram administrados nos animais 20 e 5 min, respectivamente, antes dos treinos. O teste e o reteste (30 s de intervalo) foram realizados medindo: **(A)**: latência de saída do braço fechado em (s) e **(B)**: avaliação de risco. As barras representam a média  $\pm$  EPM (8-12 animais). \*: diferença significativa em relação ao respectivo grupo salina. (Teste LSD,  $p < 0,05$ ).



## 5. DISCUSSÃO

A série de experimentos efetuados no presente estudo evidenciou que o antagonista canabinóide SR141716A melhora a etapa de consolidação da memória de fundo aversivo em camundongos testados no LTE. Estes resultados confirmam e estendem recente literatura descrevendo o efeito facilitador da memória, induzido pelo SR141716A em outros modelos experimentais (Terranova *et al*, 1996; Lichtman, 2000; Marsicano *et al*, 2002).

O modelo do LTE tem sido utilizado para avaliação de aspectos de ansiedade e memória em ratos, mas pouco avaliado em camundongos. Sanson e Carobrez (1999) utilizaram um procedimento em ratos, os quais são expostos sucessivamente ao LTE até atingir um critério de esquiva e testados após um intervalo de tempo. Utilizamos esse mesmo procedimento em camundongos, com a inclusão de novos parâmetros, sendo que o modelo do LTE mostrou-se eficaz para a avaliação do aprendizado e memória nesta espécie.

Por outro lado, cabe ressaltar que o processo inicial da memória está intimamente relacionado com aspectos neuronais envolvidos com percepção sensorial, atenção, motivação e demais ramificações neuropsicológicas. Assim, na aquisição da informação, o animal está diante de uma nova situação, sendo importante a atenção, o alerta, a concentração e a exploração (Brandão, 1995). Contudo, o uso farmacológico de investigação pode interferir nesses aspectos neuronais, acarretando alterações significativas no

desempenho do aprendizado e da memória. Nesse sentido, já que neste estudo utilizou-se um antagonista canabinóide, o SR141716A, e há evidências de que o  $\Delta^9$ -THC prejudica a atenção (Abel, 1971), a hipótese do sistema canabinóide influenciar aspectos relacionados com a atenção não pode ser descartada neste modelo. Nessa mesma linha, o fator ansiedade deve ser considerado, já que dados da literatura mostram que doses mais elevadas de SR141716A (3 mg/Kg) apresentam um efeito ansiogênico em ratos (Navarro *et al*, 1997).

Diante disso, no presente trabalho, optou-se por se verificar, no modelo do LCE, a reação dos animais tratados com as doses adotadas do SR141716A, 20 min antes da sua avaliação neste modelo de ansiedade. Observamos que este antagonista canabinóide não provocou comportamento ansiogênico ou ansiolítico em camundongos; somente a dose mais elevada (2 mg/Kg) apresentou uma tendência ansiogênica. No entanto, salientamos que esse fato não exclui totalmente a possibilidade do SR141716A influenciar a ansiedade do animal, no LTE, já que se trata de um outro modelo com protocolo experimental diferente.

A abordagem inicial dos estudos com o SR141716A, no presente trabalho, foi a administração deste antagonista antes do período de treino no LTE, com o objetivo de verificar se o SR141716A poderia interferir no processo de aquisição da EI, e se haveria alteração no desempenho dos animais no teste do dia seguinte.

Assim, os experimentos iniciais com as diferentes doses do antagonista canabinóide SR141716A, administradas antes do treino, mostraram que entre o grupo controle e o grupo tratado não houve qualquer diferença estatística no número de treinos ou no total das latências registradas no decorrer do treinamento, para alcançar o critério de EI. Vale lembrar que, apesar de não ser detectado neste modelo, não descartamos a influência do sistema canabinóide na atenção do animal, em se tratando de processos envolvendo o

aprendizado e a memória. Deste modo, enquanto a aquisição da EI durante o treino no LTE, representa um processo de aprendizado, a resposta de esquiva na reexposição do animal ao LTE, vinte e quatro horas após, mostra que o animal evocou a informação adquirida, indicando um possível parâmetro para a avaliação da memória.

No teste, os animais controles apresentaram uma baixa latência da resposta de EI, na primeira exposição ao LTE. Este é um dado relevante em nossos estudos, já que isso não acontece com ratos, os quais apresentaram latência elevada no dia do teste (Sanson e Carobrez, 1999).

Podemos cogitar algumas hipóteses para tentar explicar esse comportamento dos camundongos.

Primeira: o camundongo é mais impulsivo do que o rato, com uma maior tendência à exploração, o que poderia causar uma menor latência no dia do teste. Essa hipótese tem como consequência a interpretação de que os resultados do teste seriam principalmente decorrentes de aspectos de impulsividade da exploração e não de aspectos cognitivos como a memória.

Segunda: o camundongo é mais “ansioso” (Jardim *et al*, 1999) e com um comportamento mais disperso do que o rato, o que pode indicar uma pior retenção da informação. Esse enfoque engloba aspectos da atenção que podem interferir em processos de aquisição ou retenção da informação (Brandão, 1995).

Terceira: talvez, apenas traços da memória tenham sido consolidados, resultando em uma resposta parcial da EI adquirida no dia anterior. Essa etapa de consolidação acontece após o aprendizado, através de um processo de retenção da informação ou de parte dela (Schafe *et al* 2001).

Quarta: é possível que os animais possam ter adquirido e consolidado a informação, mas apresentado deficiência na evocação (recuperação) da informação armazenada.

Quinta: o baixo nível de resposta do grupo-controle pode ser devido à ocorrência da extinção de parte da memória, decorrente da aquisição de outras informações e formação de novas memórias, em detrimento daquela adquirida no treinamento.

Apesar dessas considerações sobre camundongos controles, os animais tratados com o SR141716A (1mg/Kg) antes do treino, apresentaram, no teste do dia seguinte, um melhor desempenho na resposta de EI, ou seja, uma maior latência de EI e uma menor avaliação de risco. Aqui, cabe lembrar que a avaliação de risco indica o conflito do animal de sair ou não do braço fechado. Esse parâmetro foi utilizado no teste, onde a diminuição de tentativas de sair do braço fechado (refletindo uma menor avaliação de risco) significa uma maior resposta de esquiva. Esses dados indicam que estes animais tiveram mais facilidade em apresentar respostas de esquiva no teste, as quais haviam sido adquiridas (aprendidas) no dia anterior, sugerindo um melhor desempenho desses animais na memória avaliada no LTE.

Além desses resultados, um outro dado que merece atenção, é a inclusão, no protocolo experimental, de um segundo teste (reteste), 30 s após o primeiro. Assim, apesar do desempenho do grupo controle no teste, discutido anteriormente, no reteste, tanto o grupo controle como o grupo tratado apresentaram uma resposta elevada da EI. Esse perfil de resposta impede a detecção de diferenças entre os grupos analisados, já que as respostas de todos foram relativamente próximas do valor de esquiva máximo. Assim, apesar do reteste ser um parâmetro novo e necessitar de estudos mais detalhados, sugerimos algumas interpretações desses resultados iniciais.

Os resultados com o reteste sugerem que a informação adquirida no treino esteja parcial ou totalmente armazenada e que, no entanto, para evocá-la, foi necessário um gatilho, no caso, uma reexposição, a qual facilitou a recuperação da memória. Esse fenômeno é denominado reativação (Nader *et*

*al*, 2000; Abel e Lattal, 2001) e envolve um contato prévio para evocar e relembrar o que já havia sido aprendido.

Outra interpretação é que a reexposição funcionaria como um novo treino, um novo aprendizado, reconstruindo as conexões que estavam incompletas, ocorrendo um processo conhecido como reconsolidação (Nader *et al*, 2000; Schafe *et al*, 2001).

De fato, estudos têm mostrado que no processo de reteste, ou reativação de uma memória já consolidada, ocorre um novo processo de consolidação, ou seja, uma reconsolidação. Nesse processo, volta-se a abrir uma nova janela temporal, com eventos moleculares similares à memória de curto prazo, suscetível a interferências (Przybylski e Sara, 1997; Schafe *et al*, 2001; Abel e Lattal, 2001). É a base para que circuitos neuronais já existentes sejam remodelados ou desfeitos, podendo ocorrer um fortalecimento da memória reativada ou mesmo uma amnésia, seja por indução ambiental, como o treinamento, ou interferência farmacológica.

Esse perfil mostrado pelo reteste pode contribuir para a interpretação dos baixos níveis da EI no teste, apresentados pelos grupos controle. Assim, como discutido anteriormente, uma das possibilidades seria devido à característica de o camundongo ser mais impulsivo e, portanto, ter uma baixa latência no teste. Se essa hipótese fosse de todo verdadeira, por que o animal, 30 s após o primeiro teste, no reteste, perderia essa característica impulsiva, de modo tão evidente, apresentando uma latência de EI elevada? Deveria, ao menos, aumentar sua latência de esquiva de forma gradativa, como no treinamento. No entanto, o que ocorre é uma elevação da latência de esquiva já no segundo teste. Esse perfil sugere que fatores cognitivos, como o aprendizado e a memória, possam estar envolvidos nessas respostas do que fatores exclusivamente decorrentes da impulsividade característica da espécie.

Desconsiderando uma possível influência significativa do SR141716A no fator da impulsividade e para minimizar definitivamente a influência de

outros fatores que pudessem interferir no processo de aquisição, o SR141716A (1 mg/Kg) foi administrado após o treino, para verificar a hipótese de sua influência no processo de consolidação da memória.

Nesse sentido, os animais tratados apresentaram novamente o melhor desempenho da resposta de EI no teste, tanto na latência como na avaliação de risco. Este fato sugere que o SR141716A, administrado após o treino, influencia o processo de passagem da informação adquirida para a memória de longo prazo, ou seja, confirmando a sua interferência na consolidação da memória.

Para aprofundar um pouco mais os estudos do SR141716A na consolidação da memória, buscou-se avaliar se o perfil de memória mantinha-se após um período mais longo, no caso, 7 dias. No primeiro teste, não houve diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratado com SR141716A. No entanto, no reteste, a latência de esquia do grupo tratado aumentou muito mais do que a do grupo controle, mostrando que o tratamento realizado 7 dias antes, ainda exercia influência nas respostas de esquia dos camundongos. Com esse resultado, pode-se sugerir que, uma semana após o treino, os grupos apresentem possivelmente traços de memória, de tal forma que no primeiro teste não ocorra a sua evocação, mas que haja uma reativação da memória. Assim, o grupo tratado manifesta a EI no reteste, talvez, devido ao fortalecimento de suas conexões neuronais (plasticidade), que teria ocorrido no processo de consolidação, ou, como já explicado, pela reconstrução dessas conexões em um novo processo de aprendizado. É possível, ainda, que o SR141716A atenuo o processo de extinção da memória, refletindo o melhor desempenho dos animais tratados após uma semana. Dados recentes na literatura têm apontado nessa direção, indicando a participação do SR141716A na extinção da memória (Marsicano *et al*, 2002).

Após detectarmos os efeitos do SR141716A na consolidação da memória, o enfoque experimental seguinte foi verificar se o SR141716A

também exerceria influência na evocação da memória no teste 24 h após o treino. Os resultados mostraram que, se o antagonista é administrado alguns minutos antes do teste no LTE, não ocorre, de modo significativo, uma melhor resposta de EI. Portanto, o SR141716A não atua na facilitação da evocação da memória no teste 24 h após o treino.

De fato, está bem descrito na literatura (Izquierdo *et al*, 1992, 1999; Izquierdo e Medina, 1997; McGaugh, 2000) que existe um período de seis a nove horas (janela temporal), após a aquisição da informação, em que o processo de consolidação da memória é susceptível a interferências, principalmente farmacológicas. Assim, como verificado anteriormente, a administração do SR141716A, imediatamente após a aquisição, pode ter interferido em aspectos das atividades neuronais, como a plasticidade e a potenciação de longo prazo, fortalecendo as conexões sinápticas e, com isso, consolidando a informação adquirida. No entanto, ao ser administrado vinte e quatro horas após o treino, pouco antes do teste, a janela temporal para interferir no fortalecimento das conexões já está ausente. Desta forma, o antagonista canabinóide SR141716A não mais estaria interferindo no processo de consolidação e, por esse motivo, não influenciou significativamente na evocação da memória.

Uma outra abordagem do presente trabalho teve por base o fato de que fármacos indutores de amnésia têm sido utilizados em modelos animais para avaliar drogas que possam reverter o déficit de memória e indicar o potencial dessas drogas na melhora do desempenho cognitivo (Porsolt *et al*, 1993). Nesse sentido, o LTE tem sido validado para ratos injetados com benzodiazepínicos como o diazepam, que além de efeitos ansiolíticos apresenta reconhecido efeito amnésico (Conde *et al*, 1999). Além disso, a escopolamina, classicamente utilizada para indução amnésica, também foi avaliada em ratos no LTE (De Mello e Carobrez, 2002). Em ambos os casos, após a injeção das drogas houve pouco ou nenhum prejuízo na aquisição da

esquiva no treinamento e evidente diminuição das respostas nos testes, indicando déficit de memória.

No presente estudo, os resultados reproduziram esse perfil em camundongos, a partir de uma curva de seleção de doses da escopolamina e do agonista benzodiazepínico midazolam, obtendo respostas que não afetaram a aquisição e produziram efeitos amnésicos nos testes.

Além disso, em nosso protocolo utilizando o reteste, a hipótese de efeito amnésico torna-se mais evidente. De fato, enquanto o grupo salina apresentou um aumento da esquiva no reteste, os grupos tratados com essas drogas amnésicas diminuíram suas respostas no reteste. Esses resultados sugerem que as respostas do reteste não podem ser interpretadas exclusivamente como um novo treino isoladamente, mas sim como uma resposta decorrente do aprendizado anterior e, portanto, passível de avaliação de déficit de memória.

A partir do perfil da curva de seleção de doses do midazolam e da escopolamina, neste modelo do LTE em camundongos, foi possível avaliar a interação do SR141716A com as respostas induzidas por essas drogas. Os resultados indicaram que o pré-tratamento com o antagonista canabinóide SR141716A na dose de 1mg/Kg diminui os efeitos amnésicos da escopolamina no teste. No entanto, essa dose é a mesma que ocasionou um melhor efeito *per se* no desempenho dos animais, como observado nos estudos do SR141716A discutidos anteriormente neste trabalho. Apesar disso, interessante no reteste, todas as doses de SR141716A inibiram o efeito prejudicial da escopolamina, nas respostas de esquiva. Desta forma, o conjunto dos resultados sugerem que o SR141716A atenua o prejuízo da EI provocado pela escopolamina.

Sabe-se que a acetilcolina é um importante neurotransmissor envolvido na atenção (Perry *et al*, 1998) e memória (Aigner, 1995) sendo os subtipos de receptores muscarínicos da acetilcolina, M1 e M4, os mais abundantes no



cérebro (Levey *et al*, 1991). Além disso, considerando que receptores canabinóides são também abundantemente expressos nas mesmas regiões cerebrais e medeiam efeitos opostos ao da acetilcolina na cognição, cogita-se a participação de endocanabinóides, como a anandamida, e do sistema colinérgico na modulação da memória.

Realmente, ambos, acetilcolina e ligantes canabinóides tem sido bem conhecidos por exercerem efeitos em vários processos associados com a cognição, sendo a acetilcolina um agente facilitador e os ligantes canabinóides indutores de déficits no aprendizado e na memória (Hampson e Deadwyler, 1998). Nesse sentido, estudos tem mostrado o antagonismo fisiológico entre os sistemas colinérgico central e o canabinóide na memória operacional (Braidá e Sala, 2000). Além disso, canabinóides são também capazes de interferir na síntese (Friedman *et al*, 1976) e/ou na liberação de acetilcolina (Domino e Bartolini, 1972; Gessa *et al*, 1997), e este pode ser um outro possível mecanismo pelo qual os canabinóides podem exercer os seus efeitos modulatórios negativos na cognição. Outros estudos tem demonstrado que o antagonista canabinóide SR 141716A *per se* facilita a liberação de acetilcolina no hipocampo aumentando a sua concentração nessa região. Esses dados indicam a possibilidade da modulação da memória ocasionada pelo SR141716A ocorrerem com a participação do sistema colinérgico o que é reforçado pelos resultados do presente trabalho que mostra que o déficit de memória ocasionada pela escopolamina é revertida pelo SR141716A. Assim, é possível que o receptor CB1 module a liberação de acetilcolina em neurônios colinérgicos da via septohipocampal no giro denteado do hipocampo. Esses dados sugerem a hipótese de um tônus fisiológico modulado por endocanabinóides que, quando bloqueados, diminuiriam a sua inibição na liberação de acetilcolina, aumentando os níveis desse neurotransmissor.

Cabe lembrar que, uma reversão dos déficits provocados por escopolamina, através do SR141716A, não foi evidenciada em outros estudos realizados em macacos (Nakamura-Palácios *et al*, 2000) ou ratos (Lichtmam e Martin, 1996). Além disso, os estudos anteriores envolviam déficit de aprendizado e de memória espacial.

Outras evidências sugerem que a redução de acetilcolina provocada por canabinóides não está “temporalmente” relacionada ao déficit de memória operacional e que esses dois mecanismos estejam dissociados ou, mais provável, exista um outro sistema envolvido, como o dopaminérgico (Jentsch *et al*, 1998). Nesse sentido, além da possível atuação direta de receptores CB1 em neurônios colinérgicos, estudos recentes descrevem a localização desses receptores no hipocampo e uma visão mais complexa do seu possível papel na modulação da memória e seu envolvimento com outros sistemas nesse processo. Assim, os receptores CB1 estariam localizados em axônios terminais de interneurônios GABAérgicos inibitórios (Tsou *et al*, 1999; Katona *et al*, 2000; Wilson e Nicoll, 2002) e a ativação desses receptores diminuiria a liberação de GABA. Dessa forma, esses interneurônios podem interferir em oscilações sincronizadas em determinadas taxas de frequência interferindo na consolidação da memória (McBain *et al*, 1999; Katona *et al*, 2000). Em suma, considerando os interneurônios GABAérgicos como uma rede de conexões interligadas a outros neurônios, como os glutamatérgicos ou colinérgicos, (McBain *et al*, 1999), tem-se uma visão da complexidade dessa rede e pode-se supor que o antagonista canabinóide SR141716A poderia exercer seus efeitos indiretamente em diferentes sistemas.

Outra possibilidade de interação entre o sistema colinérgico e canabinóide decorre de estudos indicando a participação de endocanabinóides interferindo em outros sistemas de receptores. No caso do sistema colinérgico, experimentos demonstraram que anandamida foi capaz de inibir a ligação do agonista para receptores muscarínicos em homogenatos derivados de cérebro

humano (Lagalwar *et al*, 1999). Este dado sugere que a anandamida pode ter um papel importante direto no sistema colinérgico além dos efeitos dos receptores canabinóides.

Apesar do presente modelo não ter detectado experimentalmente uma interação clara entre o midazolam e o SR141716A, a possibilidade de uma relação entre mecanismos canabinóides e GABAérgicos não pode ser descartada. Como foi relatado anteriormente, a existência de receptores CB1 localizados em interneurônios GABAérgicos inibitórios (Tsou *et al*, 1999; Katona *et al*, 2000; Wilson e Nicoll, 2002) fortalece a hipótese de interação entre esses dois sistemas, necessitando portanto, de estudos mais aprofundados para uma interpretação conclusiva dessa relação. Cabe lembrar que o processo de memória é complexo e a administração sistêmica de drogas dificulta uma análise pontual nesse sentido.

A investigação de “onde” e “como” o SR141716A estaria exercendo o seu papel na modulação da memória exige estratégias experimentais e recursos técnicos que fogem ao alcance do presente trabalho. No entanto, o apoio literário serve como ferramenta para especularmos as possibilidades envolvidas e direcionarmos futuros experimentos que contribuam para a resposta dessas questões.

Assim, considerando que no presente trabalho o SR141716A apresentou sua ação no processo de consolidação da memória, pode-se cogitar a possível participação do hipocampo nesse processo. O hipocampo é uma estrutura cerebral situada na região do lobo temporal, que possui importante participação na formação da memória espacial, de longo prazo e do processo de consolidação da memória (Machado, 1998; Riedel e Micheau, 2001). Além disso, apesar do presente estudo não ter realizado ensaio de ligação específica (*binding*) para o receptor canabinóide, sabe-se que há no hipocampo alta densidade de receptores canabinóides do tipo CB1 (Herkenham *et al*, 1991).

Deste modo, a existência de receptores canabinóides em uma estrutura envolvida com o processo de consolidação da memória sugere um possível local no qual os ligantes canabinóides poderiam exercer sua ação na modulação da memória. Considerando que o hipocampo tem participação também na memória espacial, alguns estudos sugerem a atuação do sistema canabinóide no hipocampo. Nesse sentido, em estudos anteriores em nosso laboratório, Da Silva e Takahashi (2002) mostraram que a administração sistêmica de  $\Delta^9$ -THC em camundongos prejudica a memória espacial no labirinto aquático de Morris (LAM), possivelmente pela ativação do receptor CB1, já que esse déficit foi revertido pelo antagonista canabinóide SR141716A. Outros modelos, essencialmente de memória espacial, como o labirinto radial, têm mostrado o papel do  $\Delta^9$ -THC em causar déficit nesse tipo de memória, indicando o envolvimento do sistema canabinóide, mais precisamente de receptores CB1, nesta modulação (Lichtman e Martin, 1996).

Alguns estudos, como o de Lichtman (2000), têm mostrado que a administração de SR141716A (3 mg/Kg) melhora a memória espacial em ratos no labirinto radial. Na mesma direção, camundongos mutantes que não expressam os receptores CB1 apresentaram um melhor desempenho em teste de memória de reconhecimento de objetos (Reibaud *et al*, 1999).

Assim, considerando a possibilidade do sistema canabinóide estar atuando na modulação da memória no hipocampo, um dos possíveis mecanismos para alteração de memória seria a ação sobre processos de plasticidade relacionados a esse fenômeno. Nesse sentido, a literatura mostra que a participação do sistema canabinóide se torna mais evidente. De fato, a ação do  $\Delta^9$ -THC e outros canabinóides de inibir a formação do potencial de longo prazo (LTP) já foi observado em vários experimentos (Nowicky *et al*, 1987; Terranova *et al*, 1995). Da mesma forma, a administração de ligantes endógenos, como anandamida e 2- araquidonilglicerol, tem bloqueado a formação de LTP no hipocampo. De modo contrário, camundongos mutantes

que não expressam receptores CB1 apresentam um maior LTP em estudos do hipocampo, *in vitro*.

Diante da complexidade dos processos de formação da memória, é possível que o sistema canabinóide interaja, no hipocampo, com outras estruturas envolvidos nesses processos. Nesse sentido, cabe lembrar que o fundamento do LTE está baseado em estímulo aversivo e na formação de uma resposta de medo condicionado. Desta forma, o estímulo aversivo do modelo implica em outras regiões cerebrais, além do hipocampo, envolvidas com esse tipo de memória.

Assim, em aspectos envolvidos com o comportamento de defesa e estímulos emocionais de medo e ansiedade, a amígdala parece ter um papel fundamental. De fato, Chacur *et al* (1999) mostraram que a simples exposição de ratos ao LCE por cinco minutos implica em alteração da expressão de receptores benzodiazepínicos na amígdala e no hipocampo, indicando a participação dessas duas estruturas na modulação da memória espacial e das respostas emocionais do ambiente potencialmente aversivo.

Recentemente, Silveira *et al* (2001) demonstraram que a expressão da proteína *Fos* (marcador de ativação neuronal), em regiões cerebrais conhecidamente envolvidas com comportamento de defesa e ansiedade, como o hipotálamo, a amígdala e a substância cinzenta periaquedutal, reforçam as características de aversividade induzidas pela exposição do animal ao LTE.

Há indícios de que o complexo amigdalóide, em particular o núcleo basolateral da amígdala (BL), modula processos de memória no hipocampo e circuitos relacionados, além de modular o córtex entorrinal, envolvido no armazenamento da memória (Izquierdo e Medina, 1997; Cahill e McGaugh, 1998).

Nesse sentido, estudos mostrando que a ativação da amígdala melhora a memória de tarefas dependentes do hipocampo sugerem fortemente que a amígdala influencia a atividade neural, e possivelmente o armazenamento da

memória em outras regiões cerebrais. Assim, lesões da amígdala parecem impedir o prejuízo da memória induzido pela administração sistêmica de agonistas GABAérgicos, e a administração de benzodiazepínicos na amígdala prejudica a memória (Dickinson-Anson e McGaugh, 1997).

Do que foi descrito até o momento, é possível especular que a amígdala possa estar atuando nos experimentos realizados neste estudo, devido ao caráter aversivo do LTE. Além disso, é possível que a facilitação da consolidação da memória, através do SR141716A, ocorra via receptores CB1 no hipocampo, e que esse processo pode ser modulado pela amígdala, que também possui receptores CB1, embora em quantidade mais moderada (Tsou *et al*, 1998).

No mesmo sentido, apesar do presente trabalho não ter avaliado o processo de extinção da memória, um estudo bastante recente mostra o SR141716A atenuando a extinção da memória, e sugerindo a participação de endocanabinóides na amígdala nesse processo (Marsicano *et al*, 2002). Nesse estudo, foi adotado o protocolo do medo condicionado auditivo, condicionamento de um som seguido de choque e, após algum tempo, o teste de extinção, com a apresentação do som repetidas vezes sem o choque, até o desaparecimento das reações de medo do animal. Foi verificado, ainda, que com a apresentação do som durante a extinção, os níveis de endocanabinóides aumentam na amígdala basolateral. Ao se administrar SR141716A, a extinção da memória é atenuada e as reações de medo persistem por mais tempo. Além disso, foram identificados receptores CB1 em interneurônios GABAérgicos na amígdala basolateral. Os autores sugerem a possível participação de endocanabinóides na modulação da extinção da memória por meio de receptores CB1 regulando interneurônios GABAérgicos na amígdala (Marsicano *et al*, 2002). Apesar desse estudo não ter detectado interferência do SR141716A na aquisição ou consolidação da memória, essa referência é

importante para o presente trabalho, pois fortalece a hipótese do envolvimento de endocanabinóides na modulação da memória.

No entanto, devemos ressaltar que, além da hipótese de uma modulação decorrente de endocanabinóides, há indícios em outras direções. Assim, outra possibilidade é que o SR141716A possa estar exercendo seus efeitos como agonista inverso sobre receptores CB1 (MacLennan *et al*, 1998) e, desta forma, implicando em receptores constitutivamente ativados, inibindo a liberação de acetilcolina (Gessa *et al*, 1997). Além disso, existem estudos indicando um novo receptor (“CB3”) ou sítio, ao qual o SR141716A poderia ligar-se e exercer seus efeitos (Hájos *et al*, 2001; Wilson e Nicoll, 2002).

Em resumo, embora os estudos deste trabalho não tenham detectado a influência do SR141716A nas etapas de aquisição e evocação da memória no LTE, deixaram claro a participação desse antagonista no processo de consolidação da memória em camundongos. Nos estudos farmacológicos envolvendo agentes amnésicos, o SR141716A atenuou o prejuízo induzido pela escopolamina na EI, porém sem interferir com os efeitos do midazolam. Esses resultados contribuem para o entendimento do sistema canabinóide nos processos da modulação da memória de fundo aversivo, como a estudada no LTE. Além disso, estes resultados confirmam o efeito facilitatório do SR141716A em outros modelos experimentais de memória (Terranova *et al*, 1996; Lichtman, 2000; Marsicano *et al*, 2002), ressaltando a importância de endocanabinóides na modulação da memória.

## 6. CONCLUSÃO

- O antagonista canabinóide SR141716A melhorou o desempenho na memória de camundongos avaliada no LTE, atuando na consolidação da memória.
- A influência do SR141716A na consolidação da memória mostrou-se duradoura, sendo detectada até uma semana após o treino, no reteste.
- O SR141716A atenuou o prejuízo na esQUIVA inibitória induzido pela escopolamina, sem afetar o prejuízo provocado pelo midazolam.
- Estes resultados sugerem um envolvimento parcial de mecanismos colinérgicos nos processos de memória influenciados pelo SR141716A.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, E.L. Marijuana and memory: acquisition or retrieval? *Science*. 173: 1038-1040, 1971.

ABEL, T.; LATTAL, K.M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*. 11: 180-187, 2001.

AIGNER, T.G. Pharmacology of memory: cholinergic-glutamatergic interactions. *Curr Opin Neurobiol*. 5: 155-160, 1995

AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol*. 58: 315-348, 1999.

ATKINSON, R.C.; SHIFFRIN, R.M. Human memory: a proposed system and its control processes. In: K.W. Spence and J.T. Spence (Eds). *The Psychology of Learning and Motivation Advances and Research and Theory*. Vol 2, Academic Press, New York, 89: 195, 1986.

BADDELEY, A. Working-memory. *Science*. 255: 556-559, 1992.

\_\_\_\_\_. Working memory. *Life Sci*. 321: 167-173, 1998.

BAILEY, D.J.; KIM, J.J.; SUN, W.; THOMPSON, R.F.; HELMSTETTER, F.J. Acquisition of fear conditioning in rats requires the synthesis of mRNA in the amygdala. *Behav Neurosci*. 113: 276-282, 1999.

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav Brain Res*. 108: 197-203, 2000.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Anti-predator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol* 103: 70-82, 1989.

BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res.*, 58: 155-166, 1993.

BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361: 31-39, 1993.

BRAIDA, D.; SALA, M. Cannabinoid-induced working memory impairment is reversed by a second generation cholinesterase inhibitor in rats. *neuroreport* 11: 2025-2029, 2000.

BRANDÃO, M.L. *Psicofisiologia*. São Paulo: Atheneu, 1995.

BRILEY, M. Biochemical strategies in the search for cognition enhancers. Cognition enhancers: animal to man. *Pharmacopsychiatry*. 23:suppl. 75-80, 1990.

BRODKIN, J.; MOERCHBAECHER, J.M. SR 141716A antagonizes the disruptive effects of cannabinoid ligands on learning in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 282: 1526-1532, 1997.

BURES, J.; FENTON, A.A.; KAMINSKY, Y.; ZINYUK, L. Place cells and place navigation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 343-350, 1997.

CAHILL, L.; HAIER, R.J.; FALLON, J.; ALKIRE, M.T.; TANG, C.; KEATOR, D.; WU, J.; MCGAUGH, J.L. Amygdala activity at encoding correlated with long-term, free recall of emotional information. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 8016-8021, 1996.

CAHILL, L.; MCGAUGH, J.L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci*. 21: 294-299, 1998.

CAHILL, L.; MCGAUGH, J.L.; WEINBERGER, N.M. The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends Neurosci*. 24(10): 578-581, 2001.

CARTA, G.; NAVA, F.; GESSA, G.L. Inhibition of hippocampal acetylcholine release after acute and repeated  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Res*. 809:1-4, 1998.

CHACUR, C.; RAYMOND, R.; HIPÓLIDE, D.C.; GIUGLIANO, E.B.; LEITE, J.R.; NOBREGA, J.N. Immediate increase in benzodiazepine binding

in rat brain after a single brief experience in the plus maze: a paradoxical effect. *Neurosci Lett*. 269: 29-32, 1999.

CONDE, C.A.; COSTA, V.; TOMAZ, C. Measuring emotional memory in the elevated T-maze using a training-to-criterion procedure. *Pharmacol Biochem Behav* 63: 63-69, 1999.

COMPTON, D.R.; ACETO, M.D.; LOWE, J.; MARTIN, B.R. In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist SR141716A : Inhibition of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 227: 586-594, 1996.

DA SILVA, G.; TAKAHASHI, R.N. SR141716A prevents  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-induced spatial learning deficit in a morris-type water maze in mice. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry* 26: 321-325, 2002.

DAVIS, M.; WALKER, D.L.; LEE, Y. Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: differential roles in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. *Phil Trans Biol Sci*. 352: 1675-1687, 1997.

DELACOUR, J.; BASSANT, M.H.; ONOFRI, M.; SANTUCCI, V.; KLEINLOGEL, H. Electrophysiological models for the study of cognition enhancers. *Pharmacopsychiatry*. 23: 90-96, 1990.

DELORY, T.M.; OLSEN, R.W. GABA and Glycine. In: SIEGEL *et al.* *Basic Neurochemistry*, New York: Raven Press, 1994.

DE MELLO, N.; CAROBREZ, A.P. Elevated T-maze as an animal model of memory: effects of scopolamine. *Behav. Pharmacol*. 13: 139-148, 2002.

DEVANE, W. A.; DYSARZ II, F.A.; JOHNSON, M.R.; MELVIS, L.S.; HOWLETT, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol*. 34: 605-613, 1988.

DEVANE, W.A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R.G.; STEVENSON, L.A.; RIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258: 1946-1947, 1992.

DICKINSON-ANSON, H.; McGAUGH, J.L. Bicuculline administered into the amygdala after training blocks benzodiazepine-induced amnesia. *Brain Res.* 752: 197-202, 1997.

DI MARZO, V.; MELCK, D.; BISOGNO, T.; DE PETROCELLIS, L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* 21(12): 521-528, 1998.

DOMINO, E.F.; BARTOLINI, A. Effects of various psychotomimetic agents on the EEG and acetylcholine release from the cerebral cortex of brainstem transected cats. *Neuropharmacology* 11: 703-713, 1972

EDWARDS, J.G. Clinical anxiety and its treatment. *Neuropeptides*. 19: 1-10, 1991.

FANSELOW, M.S. **The midbrain periaqueductal grey matter: the midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety.** New York: Plenum, 1991.

FIBIGER, H.C. Cholinergic mechanisms in learning memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci.* 14: 220-223, 1991.

FILE, S.E. One-trial tolerance to the anxiolytic actions of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology*. 100: 281-282, 1990.

FILE, S.E.; MABBUTT, P.S.; HITCHCOTT, P.K. Characterisation of the phenomenon of 'one-trial tolerance' to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*. 102: 98-101, 1990.

FILE, S.E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behav. Brain. Res.* 58: 199-202, 1993.

FILE, S.E.; ZANGROSSI, H. 'One-trial tolerance' to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state?. *Psychopharmacology*. 100: 240-244, 1993.

FILE, S.E.; ZANGROSSI, H.; VIANA, M.; GRAEFF, F.G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology*. 111: 491-494, 1993.

FREY, U.; HUANG, Y.Y; KANDEL, E.R. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. ***Science***. 260: 1661-1664, 1993.

FRIDE, E. Anandamides: tolerance and cross-tolerance to  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol. ***Brain Res***. 697: 83-90, 1995.

FRIEDMAN, E.; HANIN, I; GERSHON, S. Effect of tetrahydrocannabinols on H-acetylcholine biosynthesis in various rat brain slices. ***Pharmacol Exp Ther***. 196: 339-345, 1976

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, structure and partial synthesis of na active constituent of hashish. ***J Am Chem Soc***. 86: 1646-1647, 1964.

GESSA, G.L.; MASCIA, M.S.; CASU, M.A.; CARTA, G. Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR141716A. ***Eur J Pharmacol***. 327: R1-R2, 1997.

GIFFORD, A.N.; ASHBY, C.R. Jr. Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist SR141716A. ***J Pharmacol Exp Ther***. 277(3): 1431-1436, 1996.

GONZALES, L.E.; FILE, S.E. A five-minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. ***J Neurosci***. 17: 1505-1511, 1997.

GRAEFF, F.G.; SCHOENFELD, R.I. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. ***J. Pharmacol Exp Ther***. 173: 277-283, 1970.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory; effect of diazepam. ***Braz J Med Biol Res***. 26: 67-70, 1993.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. (Eds.) ***Neurobiologia das doenças mentais***, Lemos Ed., São Paulo, pp. 109-144, 1996.

GRAEFF, F.G.; NETTO, C.F.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an animal model of anxiety. ***Neurosci Biobehav Rev*** 23: 237-246, 1998.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo: Atheneu, 1999.

HÁJOS, N.; LEDENT, C.; FREUND, T.F.. Novel cannabinoide-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience*. 106: 1-4, 2001.

HAMPSON, R.E.; DEADWYLER, S.A. Role of cannabinoid receptors in memory storage. *Neurobiol Dis*. 5: 474-482, 1998.

HANDLEY, S.L. and MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behavior. *Naunyn Schmiedeberg’s Arch Pharmacol*. 327: 1-5, 1984.

HASSELMO, M.E.; MCCLELLAND, J.L. Neural models of memory. *Curr Opin in Neurobiol*. 9: 184-188, 1999.

HERKENHAM, M.; LYNN, A.B.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; DE COSTA, B.R.; RICE, K.C. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*. 11: 563-583, 1991.

IMHOF, J.T.; COELHO, Z.M.; SCHIMITT, M.L. MORATO, G.S.; CAROBREZ, A.P. Influence of gender and age on performance in the elevated plus maze apparatus. *Behav Brain Res*. 56: 177-180, 1993.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. GABA A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends Pharmacol Sci*. 12: 260-265, 1991.

\_\_\_\_\_. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*. 68: 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M.B.; MEDINA, J.H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of the rats. *Behav Neural Biol*. 58: 16-26, 1992.

IZQUIERDO, I.; QUILLFELDT, J.A.; ZANATTA, M.S.; QUEVEDO, J.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P.K.; MEDINA, J.H. Sequential involvement of hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in the

formation and expression of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci*. 9: 786-793, 1997.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; MELLO E SOUZA, T.; SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 393: 18, 1998.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; VIANNA, M.R.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M. Separate mechanisms for short-and long-term memory. *Behav Brain Res*. 103: 1-11, 1999.

JARDIM, M.C.; NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G.; SOUZA, R.L.N. Evaluation of the elevated T-maze as an animal model of anxiety in the mouse. *Brain Res Bull*. 48(4): 407-411, 1999.

JENTSCH, J.D.; VERRICO, C.D.; LE, D.; ROTH, R.H. Repeated exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol reduces prefrontal cortical dopamine metabolism in the rat. *Neurosci lett* 246:169-172, 1998.

KATONA, I.; SPERLÁGII, B.; MAGLÓCZKY, Z.; SÁNTIHA, E.; KÖFALVI, A.; CZIRJÁK, S.; MACKIE, K.; VIZI, E.S.; FREUND, T.F. Gabaergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neurosci*. 100(4): 797-804, 2000.

KNOWLTON, B.J.; MANJELS, J.A.; SQUIRE, L.R. A neostriatal habit learning system in humans. *Science*. 273: 1399-1402, 1996.

LAGALWAR, S.; BORDAYO, E.Z.; HOFFMANN, K.L.; FAWCETT, J.R.; FREY, W.H. Anandamides inhibit binding to the muscarinic acetylcholine receptor. *J Mol Neurosci*. 13: 55-61, 1999.

LEDOUX, J.E. Brain mechanisms of emotional learning. *Curr Opin in Neurobiol*. 2: 191-197, 1992.

\_\_\_\_\_. Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol*. 46: 209-264, 1995.

LEVEY, A.; KITT, C.A.; SIMONDS, W.F.; PRICE, D.L.; BRANN, M.R. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *Neurosci*. 11: 3218-3226, 1991

LICHTMAN, A.H.; MARTIN, B.R.  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology*. 126: 125-131, 1996.

LICHTMAN, A.H. SR141716A Enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats. *Eur J Pharmacol*. 404: 175-179, 2000.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 92: 180-185, 1987.

MACHADO, A. *Neuroanatomia funcional*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

MACLENNAN, S.J.; REYNEN, P.H.; KWAN, J.; BONHAUS, D.W. Evidence for inverse agonism of SR141716A at human recombinant cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Br J Pharmacol*. 124: 619-622, 1998.

MALLET, P.E.; BENINGER, R.J. Attenuation of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-induced memory impairment by the cannabinoid antagonist SR141716A. *27<sup>th</sup> Annual Meeting Society for Neuroscience*. 23: 2382, 1997.

MARSICANO, G.; WOTJAK, G.T.; AZAD, S.C.; BISOGNO, T.; RAMMES, G.; CASCLO, M.G.; HERMANN, H.; TANG, J.; HOFMANN, C.; ZLEGLGÄNSBERGER, W.; DI MARZO, V.; LUTZ, B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*. 418: 530-534, 2002.

MATSUDA, L.A.; LOLAIT, S.J.; BROWSTEIN, M.J.; YOUNG, A.C.; BONNER, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346: 561-564, 1990.

McBAIN, C.J.; FREUND, T.F.; MODY, I. Glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons: precision timing without lasting plasticity. *Trends Neurosci*. 22: 228-235, 1999.

McEWEN, B.S. Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry*. 48: 721-731, 2000.

McGAUGH, J.L.; CAHILL, L.; ROOZENDAAL, B. Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 13508-13514, 1996.



MCGAUGH, J.L. Memory: a century of consolidation. *Science*. 287: 248-251, 2000.

MECHOULAM, R.; FRIDE, E. *In Cannabinoid Receptors* (Pertwee, R.G., ed.), *Academic Press*. 233-258, 1995.

MECHOULAM, R.; BEN-SHABAT, S.; HANUS, L.; LIGUMSKY, M.; KAMINSKI, N.E.; SCHATZ, A.R.; GOPHER, A.; ALMONG, S.; MARTIN, B.R.; COMPTON, D.R.; PERTWEE, R.G.; GRIFFIN, G.; BAYEWITCH, M.; BARG, J.; VOGEL, Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 50: 83-90, 1995.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol*. 48: 254-260, 1955.

MUNRO, S.; THOMAS, K.L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365(6441): 61-65, 1993.

NADER, K.; SCHAFE, G.E.; LE DOUX, J.E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. 406: 722-726, 2000.

NAKAMURA-PALACIOS, E.M.; MOERSCHBAECHER, J.M.; BARKER, L.A. The Pharmacology of SR141716A: A Review. *CNS Drugs Review* 5:43-58, 1999.

NAKAMURA-PALACIOS, E.M.; WINSAUER, P.J.; MOERSCHBAECHER, J.M. Effects of the cannabinoid ligand SR141716A alone or in combination with  $\Delta^9$ -THC or scopolamine on learning in squirrel monkeys. *Behav Pharmacol*. 11: 377-386, 2000.

NAVARRO, M.; HERNÁNDEZ, E.; MUNOZ, R.M.; DEL ARCO, I.; VILLANÚA, M.A.; CARRERA, M.R.; DE FONSECA, F.R. Acute administration of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor antagonist SR141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport*. 8: 491-496, 1997.

NOWICKY, A.V.; TEYLER, T.J.; VARDARIS, R.M. The modulation of long-term potentiation by  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in the rat hippocampus, *in vitro*. *Brain Res Bull*. 19: 663-672, 1987.

PACKARD, M.G.; HIRSH, R.; WHITE, N.M. Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *J Neurosci*. 9: 1465-1472, 1989.

PARENT, M.B.; MCGAUGH, J.L. Posttraining infusion of lidocaine into the amygdala basolateral complex impairs retention of inhibitory avoidance training. *Brain Res*. 661: 97-103, 1994.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 14: 149-167, 1985.

PENTILA, M.; PARTANEN, J.V.; SOININEN, H.; RIEKKINEN, P.J. Quantitative analysis of occipital EEG in different stages of alzheimer's disease. *Elektroencephalogr Clin Neurophysiol*. 60: 1-6, 1985.

PERRY, E.; WALKER, M.; GRACE, J.; PERRY, R. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci* 22:273-280, 1998

PERTWEE, R.G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*. 74: 129-180, 1997.

PORSOLT, R.D.; MCARTUR, R.A.; LENÈGRE, A. Psychotropic screening procedures. In: HAAREN, F.V. methods in behavioral pharmacology, Amsterdam, *Elsevier Science Publishers*. 10: 23-51, 1993.

PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S.J. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res*. 84: 241-246, 1997.

REIBAUD, M.; OBINU, M.C.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M.; BÖHME, G.A.; IMPERATO, A. Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol*. 379: R1-R2, 1999.

RICHARDSON, J.D.; AANONSEN, L.; HARGREAVES, K.M. SR141716A, A cannabinoid receptor antagonist, produces hyperalgesia in untreated mice. *Eur J Pharmacol*. 319: R3-R4, 1997.

RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 25: 835-853, 2001.

RIEKKINEN, P.; BUSZAKI, G.; RIEKKINEN, P.Jr.; SOININEN, H.; PARTANEN, J. The cholinergic system and EEG slow waves. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 78: 89-96, 1991.

RINALDI-CARMONA, M.; BARTH, F.; HEAULME, M.; SHIRE, D.; CALANDRA, B.; CONGY, C.; MARTINEZ, J.; NELIAT, G.; CAPUT, D.; FERRARA, P.; SOUBRIE, P.; BRELIERE, J.C.; LE FUR, G. SR141716A, A potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 350: 240-244, 1994.

RINALDI-CARMONA, M.; BARTH, F.; HEAULME, M.; SHIRE, D.; CALANDRA, B.; CONGY, C.; MARTINEZ, J.; NELIAT, G.; CAPUT, D.; FERRARA, P.; SOUBRIE, P.; BRELIERE, J.C.; LE FUR, G. Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci.* 56:1941-1947, 1995.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C.; COBAIN, M.R.; DALY, P.; DORAN, P.; EELLS, J.R.; WALLIS, P. Anxiogenic-like effects of luprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: Profile comparisons with 8-OH-DPAT; CGS 12066B, TFMPP and mCPP. *Behav Pharmacol.* 3: 621-634, 1992.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: *Ethology and Psychopharmacology* (Eds COOPER, S.J.; Hedrie, C.A.), Wilwy, Chichester. 9-44, 1994.

SANSON, L.T.; CAROBREZ, A.P. Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated T-maze model of anxiety. *Behav Brain Res* 101: 59-64, 1999.

SCHAFE, G.E.; NADER, K.; BLAIR, H.T.; LE DOUX, J.E. Memory consolidation of pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci.* 24(9): 540-546, 2001.

SCHLICKER, E.; KATHMANN, M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends in Pharmacol Sciences.* 22(11): 565-572, 2001.

SILVEIRA, M.C.L.; ZANGROSSI, H.Jr.; VIANA, M.B.; SILVEIRA, R.; GRAEFF, F.G. Differential expression of fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. *Behav Brain Res.* 126: 13-21, 2001.

SIMON, C.W.; EMMONS, W.H. EEG, consciousness, and sleep. *Science*. 124: 1066-1072, 1956.

SQUIRE, L.R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychol Rev*. 99(2): 195-231, 1992.

SQUIRE, L.R.; KNOWLTON, B.; MUSEN, G. The structure and organization of memory. *Annu Rev Psychol*. 44: 453-495, 1993.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; TONEGAWA, T.; NAKANE, S.; YAMASHITA, A.; ISHIMA, Y.; WAKU, K. Transacylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of N-arachidonylethanolamine, an endogenous cannabinoid-receptor ligand, in rat brain microsomes. Comparison with synthesis from free arachidonic acid and ethanolamine. *Eur J Biochem*. 240: 53-62, 1996.

TERRANOVA, J.P.; MICHAUD, J.C.; LE FUR, G.; SOUBRIÉ, P. Inhibition of long-term potentiation in rat hippocampal slices by anandamide and WIN55212-2: reversal by SR141716A, a selective antagonist of CB1 cannabinoid receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 352: 576-579, 1995.

TERRANOVA, J.P.; STORME, J.J.; LAFON, N.; PERIO, A.; RINALDI-CARMONA, M.; LE FUR, G.; SOUBRIE, P. Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR141716. *Psychopharmacology*. 126: 165-172, 1996.

TOMAZ, C.; BRANDÃO, M.L.; GARCIA-CAIRASCO, N. **Neurotransmitter interactions and cognitive functions**. Birkhaeuser Boston Inc., Cambridge, pp. 240-256, 1992.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 44: 463-469, 1993.

TSOU, K.; BROWN, S.; SAÑUDO-PEÑA, M.C.; MACKIE, K.; WALKER, J.M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid cb1 receptors in the rat central nervous system. *Neurosci*. 83(2): 393-411, 1998.

TSOU, K.; MACKIE, K.; SAÑUDO-PEÑA, M.C.; WALKER, J.M. Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing gabaergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neurosci*. 93(3): 969-975, 1999.

- VIANA, M.B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav.* 49: 549-554, 1994.
- VIVIAN, J.A.; KISHIOKA, S.; WOODS, J.H. Behavioral effects of the cannabinoid antagonist SR141716A in rhesus monkeys. *27<sup>th</sup> Annual Meeting Society for Neuroscience.* 23: 1869, 1997.
- WILSON, R.I.; NICOLL, R.A. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science.* 296: 678-681, 2002.
- WINSAUER, P.J.; LAMBERT, P.; MOERSCHBAECHER, J.M. SR141716A Antagonizes the effects of  $\Delta^9$ -THC on complex behavioral processes in monkeys. *FASEB J.* A205, 1997.
- WITTER, M.P.; GROENEWEGEN, H.J.; DA SILVA, F.H.L.; LOHMAN, A.H.M. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol.* 33: 161-253, 1989.
- ZANGROSSI Jr., H.; GRAEFF, F.G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Res Bull.* 44 (1): 1-5, 1997.
- ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L.R. The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science.* 250: 288-290, 1990.